



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Validação de metodologia de análise de pesticidas agrícolas em águas por LC/MS

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Rita Maria dos Santos Cardoso Gonçalves de Araújo

Orientadora: Professora Doutora Arminda Alves (LEPAE-DEQ-FEUP)

Co-orientadora: Professora Doutora Lúcia Santos (LEPAE-DEQ-FEUP)

Fevereiro de 2008

Agradecimentos

À Professora Doutora Arminda Alves pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por todo o apoio e atenção que me deu durante a realização do trabalho experimental e durante a elaboração desta tese.

À Professora Doutora Lúcia Santos pelo apoio e preocupação demonstrados.

À Professora Doutora Olga Nunes por ter amavelmente emprestado o HPLC-UV do seu laboratório.

À Vera com quem trabalhei em LC/MS e me ajudou sempre que necessário.

A todos as pessoas que me ajudaram em tudo o que precisei durante o meu trabalho e me deram apoio e motivação, a Fátima, o Sr. Serafim, o Zé Luís, a Joana, a Raquel e o Nuno.

Ao LEPAE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia e ao DEQ - Departamento de Engenharia Química, pela disponibilização do espaço físico e dos meios que permitiram que este trabalho se realizasse.

Resumo

As análises multiresíduo de pesticidas em água têm sido uma preocupação crescente nos laboratórios de controlo de qualidade, principalmente se os compostos alvo forem substâncias prioritárias incluídas na Directiva da Água (2000/60/CE).

Neste tipo de análises podem surgir dois problemas principais: a diversidade dos compostos alvo (no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas) e a obrigação de cumprir os limites legais máximos quando estes estão estabelecidos. Na maioria dos casos podem ser usados métodos analíticos, em que se aplicam procedimentos de extracção, seguidos de detecção com cromatografia gasosa ou líquida de alta resolução, acoplada com espectrometria de massa, para a detecção de um grande número de compostos numa única corrida. Os métodos analíticos têm de ser validados e devem ser determinadas as incertezas globais correspondentes.

Neste trabalho foi implementado, validado e avaliado em termos de incerteza global um método multiresíduo de “screening” para determinar, em água, quatro pesticidas usados na agricultura- cimoxanil, bentazona, diurão e 2,4-D, através de extracção em fase sólida (SPE) antes da etapa de cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (HPLC-UV), bem como um método de confirmação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS/MS).

Os parâmetros de validação da metodologia analítica foram obtidos para todos os compostos em estudo com HPLC-UV. A optimização dos procedimentos em LC/MS/MS foi efectuada para os compostos alvo usando injeção directa de padrões. No entanto, o método para amostras extraídas foi apenas optimizado para o cimoxanil e a bentazona.

Os limites de detecção foram de 70 ppb, 39 ppb, 420 ppb e de 470 ppb para o cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente.

Os valores de recuperação média foram de 90,1% para o cimoxanil, 52,1% para a bentazona, 88,0% para o 2,4-D e 91,6% para o diurão.

As incertezas globais associadas ao resultado analítico foram de 10,8% para o cimoxanil, 21,8% para a bentazona, 34,5% para o 2,4-D e 55,8% para o diurão.

A metodologia analítica implementada e validada foi considerada adequada para os objectivos propostos.

Palavras Chave: Poluentes prioritários; Cromatografia líquida-espectrometria de massa; Validação.

Abstract

Multiresidue analysis of pesticides in waters is of increasing concern for quality control laboratories, mainly if the targets are the priority substances included in the Water Framework Directive (2000/60/EC).

In this kind of analysis two mainly problems can arise: the diversity of the target compounds (in terms of physico-chemical behaviour) and the obligation to accomplish the maximum legal limits when they are established. For most cases the use of analytical methods that apply an extraction procedure followed by detection with high resolution gas or liquid chromatography coupled with mass spectrometry can be used for detecting a large number of compounds in a single run. The analytical methodologies must be validated and the corresponding global uncertainties should be determined.

In this work, a multiresidue method was implemented, validated and evaluated in terms of global uncertainty which was used for four selected pesticides used in agriculture- cymoxanil, bentazone, diuron and 2,4-D - in water, by solid phase extraction (SPE) prior to liquid-chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV), as screening method and liquid-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) for confirmation.

The validation parameters of the analytical methodology were obtained for all the compounds in study with HPLC-UV. The optimization of the LC/MS/MS procedures was established for the target compounds using direct injection of standard solutions, but the methodology for extracted samples was only obtained for cymoxanil and bentazone.

The limits of detection for the screening analytical methodology were of 70 ppb, 39 ppb, 420 ppb and 470 ppb for cymoxanil, bentazone, 2,4-D and diuron respectively.

Recovery values were of 90,1% for cymoxanil, 52,1% for bentazone, 88,0% for 2,4-D and 91,6% for diuron.

Global uncertainties were 10,8% for cymoxanil, 21,8% for bentazone, 34,5% for 2,4-D and 55,8% for diuron.

The implemented and validated analytical methodology was proved adequate for the proposed objectives.

Keywords: Priority pollutants; Liquid chromatography-mass spectrometry; Validation.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Notação e Glossário	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas.....	ix
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto	1
1.2 Contributos do Trabalho	2
1.3 Organização da Tese	2
2 Estado da Arte	4
2.1 Breve caracterização dos pesticidas em estudo	4
2.2 Métodos de análise dos pesticidas em estudo.....	7
2.2.1 Princípios gerais de Extracção em Fase sólida (SPE)	9
2.2.2 Princípios gerais de LC/MS.....	12
3 Materiais e Métodos	23
3.1 Reagentes	23
3.2 Equipamento	23
3.3 Preparação de padrões	24
3.4 Extracção por SPE	26
3.5 Análise por HPLC-UV	27
3.6 Análise por LC/MS	27

4	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Optimização das condições operatórias.....	29
4.1.1	Optimização da fase móvel para HPLC-UV	29
4.1.2	Optimização das condições de extracção por SPE	32
4.1.3	Validação do procedimento analítico de "screening" por SPE-HPLC-UV	35
4.1.4	Estimativa de da incerteza analítica do método de "screening" por SPE-HPLC-UV... ..	38
4.1.5	Optimização das condições de LC/MS	40
5	Conclusões	45
6	Avaliação do trabalho realizado.....	45
6.1	Objectivos Realizados	45
6.2	Outros Trabalhos Realizados	46
6.3	Limitações e Trabalho Futuro.....	46
	Referências	47
Anexo A	Dados referentes às rectas de calibração por injeção directa de padrões de mistura.....	51
Anexo B	Dados referentes às rectas de calibração por injeção de padrões extraídos.	52
Anexo C	Dados referentes aos ensaios de precisão.....	53
Anexo D	Equações usadas para determinar os parâmetros de linearidade	54
Anexo E	Equações usadas na estimativa da incerteza global	55
Anexo F	Poster apresentado no workshop de LC/MS.....	57
Anexo G	Fragmentação de cada um dos pesticidas em estudo.....	58

Notação e Glossário

Lista de Siglas

APCI	Ionização química a pressão atmosférica
API	Ionização a pressão atmosférica
BEN	Bentazona
CIM	Cimoxanil
DC	Potencial de corrente
DCM	Diclorometano
DIU	Diurão
ESI	“Electrospray”
GC/MS	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa
HPLC	Cromatografia líquida
HPLC-UV	Cromatografia líquida com detector ultravioleta-visível
LC/MS	Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massa
LEPAE	Laboratório de Engenharia de Processo Ambiente e Energia
LLE	Extracção líquido-líquido
MET	Metanol
MS/MS	Dois níveis de fragmentação recorrendo a espectrometria de massa
MSPD	“Matrix solid-phase dispersion” comprimento da coluna
ODS	Octadecilsiloxano
QIT/TOF	Quadrupolo “ion-trap”
QqQ	Quadrupolo triplo
Q-TOF	Quadrupolo-“Time of flight”
Q-trap	3D quadrupolo-“ion-trap”
RF	Voltagem de corrente variável
SBSE	“Stir-bar sorptive extraction” espessura da membrana
SIM	“Selected ion monitoring”
SPE	Extracção em fase sólida
SPE-LC/MS	Extracção em fase sólida e cromatografia líquida com espectrometria de massa
SPME	Microextracção em fase sólida
SRM	“Selected reaction monitoring”
TCIA	Ácido tricloroacético
TOF/TOF	Dois “Time of flight” acoplados
u_e	Incerteza associada à exactidão
U_{global}	Incerteza global
$U_{m_{global}}$	Incerteza global média
u_p	Incerteza associada à precisão
u_{pp}	Incerteza associada à preparação dos padrões
u_{x_0}	Incerteza associada às rectas de calibração

Lista de Figuras

Figura 1-Procedimento de SPE (extraído de Fritz, 1999).

Figura 2-Esquema da estrutura do sistema de espectrometria de massa (extraído de Waters Corporation, 2008).

Figura 3-Esquema geral de uma interface a pressão atmosférica e fonte de iões (extraído de Niessen, 1999).

Figura 4-Representação da deformação e explosão de Coulomb resultando na produção de pequenas e micro-gotas carregadas (extraído de Niessen, 1999).

Figura 5-Quadrupolo linear (extraído de Waters Corporation, 2008).

Figura 6-Ilustração de um quadrupolo triplo (extraído de Kuster *et al*, 2006).

Figura 7 - Quadrupolo “ion trap” com fonte de iões externa (extraído de Niessen, 2006).

Figura 8- Electromultiplicador (extraído de Waters Corporation, 2008).

Figura 9- Fotomultiplicador de díodos (extraído de Waters Corporation, 2008).

Figura 10- Placas de microcanal (extraído de Waters Corporation, 2008).

Figura 11-Procedimento de SPE utilizado.

Figura 12-Cromatogramas dos 4 pesticidas em estudo obtidos por injeção de padrões individuais com concentrações de 100 ppm para a bentazona e diurão, 500 ppm para o cimoxanil e 200 ppm para o 2,4-D recorrendo a um fluxo de 1,0 mL/min e $\lambda=245$ nm.

Figura 13-Cromatograma dos 4 pesticidas em estudo obtido por injeção de um padrão de mistura com bentazona (20 ppm), cimoxanil (125 ppm), diurão (60 ppm) e 2,4-D (40 ppm) usando um fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min e um comprimento de onda de 230 nm.

Figura 14-Esquema do procedimento de SPE anteriormente referido.

Figura 15-Cromatograma de um extracto recorrendo à metodologia apresentada na figura 14.

Figura 16-Cromatograma de um padrão de cimoxanil 500 ppb, bentazona 2500 ppb, 2,4-D 1400 ppb e diurão 800 ppb extraído nas condições do método C utilizando a coluna Nucleosil da Macherey-Nagel.

Figura 17-Rectas de calibração obtidas para cada um dos pesticidas por injeção directa de padrões de mistura.

Figura 18-Rectas de calibração obtidas para cada um dos pesticidas por injeção de padrões extraídos.

Figura 19-Fotografia do LC/MS utilizado.

Figura 20-Representação em corte do espectrómetro de massa (extraído de Varian, 2007).

Figura 21-Cromatograma obtido por injeção directa de um padrão de bentazona de 1 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS.

Figura 22-Cromatograma obtido por injeção directa de um padrão de cimoxanil de 5 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS.

Figura 23-Cromatograma obtido por injeção de um padrão extraído de cimoxanil de 2,5 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS/MS.

Figura 24-Cromatograma obtido por injeção de um padrão extraído de bentazona de 0,5 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS/MS.

Lista de Tabelas

Tabela 1-Propriedades físicas dos pesticidas em estudo.

Tabela 2-Aductos mais comuns encontrados nos modos de ionização positiva e negativa (extraído de Niessen, 2006).

Tabela 3-Valores de concentração dos padrões de cimoxanil (CIM), de bentazona (BEN), diurão (DIU) e 2,4-D em ppb necessários para preparar os padrões de mistura.

Tabela 4-Valores de concentração dos padrões de cimoxanil (CIM), de bentazona (BEN), diurão (DIU) e 2,4-D em ppb, assim como o volume de padrão MIX_0 que foi utilizado.

Tabela 5-Valores de concentração de cada um dos pesticidas em cada padrão de mistura (Cf), assim como o volume de padrão-mãe utilizado para preparar o padrão (Vret).

Tabela 6-Descrição das condições operatórias por LC/MS em que a água é o solvente A e o acetonitrilo, o solvente B.

Tabela 7-Descrição das condições de aquisição de dados em LC/MS.

Tabela 8-Condições de extracção por SPE (A, B, C e D).

Tabela 9-Valores de concentração, número de ensaios, recuperação média (% Rmédia) e o coeficiente de variação em percentagem para ensaios a um nível de concentração (precisão/exactidão) e a níveis de concentração diferentes.

Tabela 10-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o cimoxanil.

Tabela 11-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o bentazona.

Tabela 12-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o 2,4-D.

Tabela 13-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o diurão.

Tabela 14-Valores de concentração e áreas obtidas para cada um dos pesticidas por injeção directa de padrões de mistura e que foram usados para a recta de calibração.

Tabela 15-Dados de linearidade das rectas de injeção directa para cada um dos pesticidas em estudo, cimoxanil (CIM), bentazona (BEN), 2,4-D e diurão (DIU), em que $S_a/a\%$ é o desvio-padrão relativo do declive.

Tabela 16-Valores de concentração e áreas obtidas para cada um dos pesticidas por injeção de padrões de mistura extraídos e que foram usados para a recta de calibração.

Tabela 17-Dados de linearidade das rectas injeção de padrões extraídos para cada um dos pesticidas em estudo, cimoxanil (CIM), bentazona (BEN), 2,4-D e diurão (DIU), em que S_a/a é o desvio-padrão relativo do declive.

Tabela 18-Valores de concentração, área dos picos, área média e coeficiente de variação para cada um dos compostos.

1. Introdução

1.1. Enquadramento e apresentação do projecto

O uso intensivo de pesticidas na agricultura e a poluição adicional, causada pela emissão industrial, durante a sua produção, tem resultado na ocorrência de resíduos destes químicos e dos seus produtos de transformação em alimentos, águas e solos.

Atendendo ao seu modo de acção, conhecido ou suposto, estes xenobióticos podem ser classificados nos seguintes grupos principais: herbicidas, insecticidas, reguladores do crescimento, fungicidas e bactericidas. Esta classificação revela-se importante, na medida em que as propriedades apresentadas pelos pesticidas de cada um dos grupos influenciam o impacto ambiental ocasionado pelos mesmos.

Apesar da grande diversidade de pesticidas aplicados para diferentes fins, apenas alguns são regulamentados pela União Europeia (Kuster *et al*, 2006). A recente Proposta de Directiva Europeia, de 17 de Julho de 2006 (2006/0129/CE), vem regulamentar os níveis máximos permitidos ou aconselhados para um conjunto de 33 substâncias prioritárias em águas. Estes níveis são, em alguns casos, extremamente baixos, e na maioria destes, ainda não têm associados métodos analíticos de referência. Por outro lado, compete aos estados-membros da União Europeia, definirem os planos de monitorização das águas, de acordo com o tipo de contaminações esperadas (por exemplo, tipo de indústrias, tipo de pesticidas aplicados na agricultura, entre outros), de forma a cumprirem as exigências de qualidade das águas residuais, superficiais e interiores definidas na referida Directiva.

Em Portugal, estão definidos pelas Comissões de Coordenação e Desenvolvimento Regional, quais os planos de monitorização aplicáveis e quais os contaminantes a analisar, bem como qual a frequência e locais de amostragem. No caso particular dos pesticidas agrícolas, existem métodos desenvolvidos para várias classes de pesticidas mas poucos métodos contemplam a análise multiresíduo, envolvendo pesticidas de diferentes classes.

Neste trabalho, procurou-se implementar um método multiresíduo aplicado a quatro pesticidas (bentazona, cimoxanil, diurão e ácido 2,4-diclorofenoxiacético) incluídos no plano de monitorização das águas da região Norte, tendo ainda como objectivos:

- Validar um método simples, mas fiável, de “screening” para análise de um elevado número de amostras, usando um método de extracção em fase sólida (SPE) e subsequente determinação cromatográfica por HPLC-UV;

- Desenvolver um método de confirmação, para as amostras em que os pesticidas fossem detectados na etapa de “screening”, usando o mesmo método de extracção em fase sólida (SPE) e subsequente determinação por LC/MS.

1.2. Contributos do trabalho

Espera-se que o trabalho desenvolvido represente uma contribuição significativa no domínio dos métodos de análise de poluentes prioritários em águas, permitindo uma resposta eficaz e adequada às necessidades de monitorização dos recursos naturais (hídricos), de forma a prevenir e combater a permanente degradação destes.

A tendência actual de utilização de métodos instrumentais de análise cada vez mais complexos, como são as técnicas hifenadas de cromatografia gasosa ou líquida com espectrometria de massa, tem a vantagem de possibilitar a inequívoca determinação dos poluentes, por vezes presentes em quantidades ínfimas. No entanto, apresenta inúmeras desvantagens como o custo do equipamento e a necessidade de existirem técnicos especializados, diminuindo as possibilidades de monitorização de um amplo número de pontos de amostragem.

Outro contributo esperado para este trabalho é a implementação de um método simples e expedito que permita efectuar uma triagem inicial de um vasto número de amostras, sendo que destas, só aquelas onde tiverem sido detectados poluentes, são sujeitas a confirmação pelas técnicas mais complexas referidas atrás.

Finalmente, espera-se poder contribuir para a definição das incertezas analíticas associadas a estes compostos, cuja informação é inexistente na literatura internacional.

1.3. Organização da tese

Na Introdução desta tese é apresentado o enquadramento do trabalho e os motivos pelos quais se torna importante desenvolver métodos multiresíduos para a detecção de poluentes prioritários, como pesticidas que se encontram presentes no ambiente.

No Estado da Arte é apresentada uma breve caracterização dos pesticidas em estudo, sendo referidas algumas propriedades físico-químicas dos compostos, as suas aplicações, os efeitos sobre a saúde e os limites legais estipulados. São também descritos os princípios gerais dos métodos de análise de pesticidas, nomeadamente a extracção em fase sólida (SPE) e a constituição e funcionamento da cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa.

Na secção correspondente a Materiais e Métodos são apresentados os reagentes e o equipamento utilizado durante a realização deste trabalho, o modo como foram preparados os padrões e as condições operatórias finais obtidas para a extracção em fase sólida, análise em HPLC-UV e LC/MS.

De seguida, surge a parte correspondente aos Resultados e Discussão, na qual são descritas e discutidas as fases de optimização da fase móvel para HPLC-UV e das condições de extracção em SPE e LC/MS. É apresentado o procedimento de validação do método de “screening” por SPE-HPLC-UV, assim como a estimativa das incertezas globais associadas.

Após o capítulo das Conclusões surge a secção de avaliação do trabalho realizado, na qual são enunciados os objectivos, outros trabalhos realizados, as limitações e trabalho futuro.

2. Estado da arte

Neste capítulo, depois de uma breve introdução sobre a utilização, os efeitos na saúde humana e a legislação, serão apresentadas as características físico-químicas das substâncias em estudo, que permitem compreender os resultados experimentais.

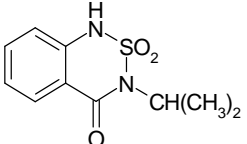
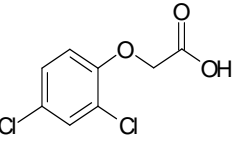
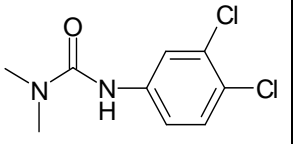
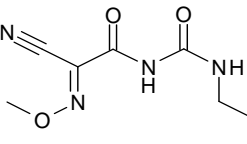
De seguida, e de uma forma brevíssima apresentar-se-ão as noções-base da técnica instrumental usada como método de extracção (SPE) e de determinação cromatográfica (LC/MS).

2.1. Breve caracterização dos pesticidas em estudo

Durante a realização deste estudo procurou-se identificar e quantificar alguns pesticidas pertencentes a vários grupos. Foram usados diurão, 2,4-D, bentazona, os quais apesar de serem herbicidas correspondem respectivamente à subclasse das fenilureias, ácidos fenoxiacéticos e benzotiodizinas, apresentando propriedades diferentes. Recorreu-se também ao estudo de cimoxanil que é um fungicida alifático hidrogenado.

Algumas características e propriedades físicas dos pesticidas usados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Propriedades físicas dos pesticidas em estudo.

Nome	Nome químico	Fórmula química	Fórmula de estrutura	Actividade	Solubilidade	pKa
Bentazona	3-isopropil-1 <i>H</i> -2,1,3-benzotiodiazina-4(3 <i>H</i>)-ona-2,2 dióxido	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$		Herbicidas Benzotiodizina	Solúvel em água: 500 mg/L (20°C) (Wells <i>et al</i> , 2000)	2,6-2,8 (Thorstensen <i>et al</i> , 2000)
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	$C_8H_6Cl_2O_3$		Herbicidas ácidos fenoxiacéticos	Solúvel em água: 900 mg/L (25°C) (Wells <i>et al</i> , 2000)	2,8 (Wells <i>et al</i> , 2000)
Diurão	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$		Herbicidas de fenilureia	36,4 mg/L (25°C) (Tran <i>et al</i> , 2006)	-
Cimoxanil	1-(2-ciano-2-metoxiiminoacetil)-3-etilureia	$C_7H_{10}N_4O_3$		Fungicidas alifáticos azotados	Solúvel em água: 890 mg/L (20°C) (Pesticide Manual, 1997)	9,70 (Pesticide Manual, 1997)

Como se pode verificar pela análise da Tabela 1, o cimoxanil e o 2,4-D são os compostos mais solúveis em água e o composto que apresenta maior tendência para ficar protonado é o cimoxanil, atendendo ao valor de pKa apresentado. Atendendo às fórmulas de estrutura, o cimoxanil é o composto mais polar, seguido pela bentazona. O diurão e o 2,4-D deverão apresentar polaridades semelhantes.

Estes pesticidas são aplicados em diferentes áreas. O diurão é utilizado no controlo de vários tipos de culturas como frutos e plantas, tendo vindo também a ser usado em áreas não agrícolas, como ruas e linhas de caminhos-de-ferro. Por sua vez, o 2,4-D tem sido aplicado num grande número de culturas, actuando como regulador do crescimento de plantas. O cimoxanil e a bentazona são também utilizados na agricultura, sendo o primeiro usado em culturas como batatas, tomates e uvas e o segundo para o controlo de ervas daninhas em culturas de milho, arroz, soja e amendoim (Giacomazzi et Cochet, 2004, EPA; IPCS; EXTTOXNET, 1997).

Têm vindo a ser efectuados estudos que demonstram a influência destes pesticidas no ambiente e as consequências na saúde humana ocasionadas pela sobre exposição a estes compostos.

Estudos em humanos revelaram que concentrações elevadas de 2,4-D afectam o sistema nervoso central e podem causar irritações no tracto gastrointestinal e na pele. Outros estudos sugerem que a exposição a 2,4-D, conjuntamente com outros pesticidas, pode aumentar a incidência de um tumor.

Por sua vez, o diurão é ligeiramente tóxico para mamíferos. Foi verificada a depressão do sistema nervoso central aquando da sobre exposição a elevadas concentrações deste composto, não tendo sido observados sintomas após a sua exposição oral (Giacomazzi et Cochet, 2004).

A bentazona e o cimoxanil apresentam um reduzido efeito toxicológico. Não foram verificados efeitos de saúde adversos como resultado da exposição ao herbicida (bentazona), assim como não são esperados efeitos endócrinos prejudiciais como resultado da exposição ao fungicida (cimoxanil). (IPCS; EXTTOXNET, 1997).

A dispersão de diurão na agricultura e a sua penetração através do solo tem levado à poluição de matrizes aquáticas subterrâneas e superficiais. Este constitui assim um poluente biologicamente activo que se encontra presente nos solos, na água e nos sedimentos tendo sido por isso considerado um dos 33 poluentes orgânicos prioritários estabelecidos pela Directiva Europeia de 17 de Julho de 2006 (2006/0129/CE), sendo o valor de concentração máximo admissível para águas superficiais e subterrâneas de 18 µg/L e o valor médio anual nas mesmas matrizes de 0,2 µg/L (Directiva Europeia, 2006).

Para os restantes pesticidas em estudo não está estabelecido um valor específico para a sua concentração, sendo os seus valores de concentração máxima admissível estabelecidos pela Directiva 98/83/CE, na qual se fixou limites para pesticidas na água para o consumo humano de 100 ng/L para cada pesticida e 500 ng/L para a soma de todos os pesticidas (Kuster *et al*, 2006).

2.2. Métodos de análise dos compostos em estudo

Existem vários métodos analíticos para a determinação dos 4 compostos em estudo em águas. Normalmente utilizam uma etapa preliminar de extracção, cujo objectivo é a remoção de interferentes e a pré-concentração e uma etapa de análise cromatográfica.

Existem vários estudos no que diz respeito a etapas de extracção e pré-concentração de pesticidas recorrendo a SPME “Solid phase microextraction” (Beltran *et al*, 2000), a SPE (Sabik *et al*, 2000), assim como outros que para além das técnicas de extracção referidas apresentam outras como “In-tube solid-phase extraction”, “Matrix Solid-Phase Dispersion” (MSPD) e “Stir-bar sorptive extraction” (SBSE) (Pico *et al*, 2007).

O facto de a maioria dos pesticidas serem polares e termolábeis faz com que actualmente a maioria das análises cromatográficas destes compostos sejam efectuadas recorrendo a LC/MS, em detrimento de GC/MS. No entanto, surgem alguns estudos nos quais se utiliza GC/MS como método cromatográfico. Para o caso do 2,4-D e da bentazona, é recomendado o processo de derivatização para melhorar a sensibilidade da sua análise por cromatografia em fase gasosa (Thorstensen *et al*, 2000 e VinK et Poll, 1996). Surgem também artigos que apresentam métodos, que apenas incluem um dos pesticidas em estudo, 2,4-D (com derivatização- Catalina *et al*, 2000) e diurão (Azevedo *et al*, 2000, Peña *et al*, 2002).

Foi publicado em 2006 um estudo que envolve as etapas de extracção e pré-concentração para pesticidas oriundos de diferentes matrizes, assim como as técnicas e

métodos de detecção cromatográfica em LC/MS, as quais foram utilizadas por alguns autores nos últimos anos (Kuster *et al*, 2006). Deste artigo foram seleccionados aqueles que recorrem ao uso de amostras de água e estudam um ou mais dos pesticidas em estudo. Um deles corresponde a um estudo de 14 pesticidas, incluindo diurão (Hogenboom *et al*, 1998), outro apresenta também um método para 35 pesticidas, incluindo diurão (Hernández *et al*, 2001) e surge um estudo com 18 pesticidas, no qual o 2,4-D e o diurão estão presentes (Stoob *et al*, 2005).

Para além dos métodos que recorrem a detecção em LC/MS existem vários artigos que apresentam técnicas de extracção em fase sólida e recorrem a HPLC-UV como etapa cromatográfica. A bentazona e o 2,4-D são incluídos num estudo de fenoxiácidos e bentazona em água recorrendo a esta combinação (Thorstensen *et al*, 2000 e Zanella *et al*, 2003), o mesmo acontece no artigo Tran *et al*, 2006, o qual contém um método que, entre outros pesticidas, permite analisar 2,4-D e diurão

Rodrigues *et al* (2006) apresentam técnicas de extracção em fase sólida e detecção por LC/MS, onde, para além de outros pesticidas, incluem diurão e cimoxanil. Foram também publicados estudos que apresentam métodos multiresíduo para a determinação de pesticidas em água recorrendo a SPE-LC/MS, os quais incluem bentazona, diurão e 2,4-D (Kampioti *et al*, 2005, Borba da Cunha *et al*, 2004 e Kuster *et al*, 2008).

Existe um artigo que apresenta um método para a determinação de 660 pesticidas recorrendo a LC/MS e GC/MS, no entanto, apenas inclui a determinação de diurão recorrendo a LC/MS/MS.

Não é do conhecimento do autor que tenham sido publicados estudos que apresentem um método simultâneo de extracção em fase sólida para os pesticidas em estudo, conjugado com a identificação e quantificação em HPLC-UV e LC/MS.

Dada a necessidade de extracção dos analitos, de forma a obter limites de detecção baixos, compatíveis com a legislação, bem como remover eventuais interferentes, a extracção em fase sólida parece ser um método que permite compatibilizar as condições experimentais para os 4 analitos simultaneamente, razão pela qual foi seleccionada neste estudo. A secção seguinte apresenta as noções básicas relacionada com a extracção em fase sólida.

Por outro lado, dada a necessidade óbvia de proceder à confirmação dos analitos por LC/MS, na secção subsequente apresentam-se umas breves noções sobre esta técnica.

2.2.1. Princípios gerais de Extracção em Fase Sólida (SPE)

Quando se efectua a identificação / quantificação de um determinado analito, é necessário proceder a etapas de extracção e de pré-concentração. As etapas de preparação da amostra, nas quais a extracção se inclui, ocupam a maior parte do tempo necessário para realizar a análise. Surge portanto a necessidade de conseguir encontrar técnicas simples que permitam reduzir o uso de solventes orgânicos, que sejam mais rápidas e baratas e que, acima de tudo, originem resultados reprodutíveis.

Inicialmente a extracção líquido-líquido era a técnica de extracção mais utilizada para fazer o “clean up” e a concentração dos analitos em estudo. No entanto, as recuperações obtidas utilizando esta técnica raramente são completas. A extracção em fase líquida constitui normalmente um procedimento demorado. Por outro lado, esta técnica recorre a grandes volumes de solventes orgânicos e origina também grandes volumes de resíduos, o que causa problemas a nível ambiental. Entre outras técnicas, que são actualmente mais utilizadas, destacam-se o SPE e o SPME, além de outras técnicas como MSPD e SBSE (Pico *et al*, 2007).

A extracção em fase sólida (SPE) é mais rápida e, geralmente, mais eficiente do que a extracção em fase líquida. As partículas usadas em SPE não são poluentes e a quantidade de solventes utilizados é muito menor do que a necessária para proceder a LLE (Fritz, 1999). Na extracção em fase sólida, os solutos são extraídos da fase líquida para uma fase sólida, normalmente constituída por partículas porosas de pequenas dimensões, nas quais a sílica se encontra ligada a uma fase orgânica ou um polímero orgânico. As substâncias que foram extraídas podem ser removidas do adsorvente recorrendo a um solvente apropriado.

Alguns dos conceitos de extracção líquido-líquido podem ser aplicados à extracção em fase sólida. Para efectuar uma extracção líquido-líquido, adiciona-se o solvente extractivo à solução de amostra aquosa num reservatório bem tapado e agita-se a ampola de decantação vigorosamente, de modo a criar uma emulsão temporária. A emulsão consiste em pequenas gotas esféricas do líquido extractivo em suspensão na fase aquosa. A área de contacto interfacial entre as duas fases tem de ser bastante grande para permitir uma rápida transferência de massa dos solutos pretendidos de uma fase para a outra. Quando se acaba de agitar deveria deixar de haver emulsão e os líquidos deveriam formar duas fases líquidas contínuas mas não miscíveis. Na prática, uma das dificuldades da extracção líquido-líquido corresponde ao facto de as emulsões se separarem muito lentamente e de um modo incompleto.

Em SPE, em vez de uma emulsão líquida temporária, o material extractivo é uma suspensão de partículas sólidas esféricas num meio aquoso. É necessária uma área interfacial entre as partículas e a amostra em solução para que haja uma transferência de massa rápida dos solutos extraídos de uma fase para a outra (Fritz, 1999). O processo de extracção de SPE pode ser dividido em 4 fases (Figura 1):

- (i) **Condicionamento** - Antes de se poder iniciar a adsorção dos analitos pela fase estacionária, o leito do adsorvente deve ser preparado e tornado compatível com a solução líquida. Para realizar a extracção de substâncias hidrofóbicas de um meio aquoso é necessário haver contacto directo entre a fase apolar (adsorvente, como C18) e a solução polar. Se não for utilizado qualquer pré-tratamento, o líquido polar passa por pequenos canais gerados no adsorvente sem efectuar o contacto necessário para ocorrer a extracção. O tratamento prévio implica o uso de um solvente intermediário que permitirá uma melhor superfície de contacto entre as fases.
- (ii) **Adsorção** - a amostra líquida a extrair é passada através da coluna de SPE recorrendo à aplicação de pressão ou à utilização de uma bomba. O fluxo utilizado deve ser constante e ter em conta as dimensões da coluna e das partículas que constituem o adsorvente sólido.
- (iii) **Lavagem** - é efectuada a lavagem de modo a remover interferentes que se encontrem coadsorvidos na matriz sólida das colunas de SPE. A água permite realizar a lavagem de iões inorgânicos do adsorvente sólido, no entanto, não é suficiente para remover outros interferentes que se encontrem fracamente adsorvidos. Nestes casos, água com 5 - 20% de solvente orgânico seria um líquido adequado. Esta etapa pode ser eliminada atendendo à técnica de SPE usada, ou substituída por uma fase de secagem com vácuo ou com um baixo fluxo de um gás.
- (iv) **Eluição** - na fase de eluição, os analitos adsorvidos são removidos da fase sólida e retornam à fase líquida, que é adequada para uma determinação analítica. O mais comum é recorrer a um líquido orgânico como eluente, embora seja possível realizar a dessorção do analito termicamente ou usando uma corrente gasosa. O solvente de eluição deve ser adicionado lenta e cuidadosamente ao adsorvente, de modo a evitar a ocorrência de canais. O mais importante é seleccionar um líquido que elua completamente os analitos da fase sólida usando o menor volume de eluente possível. O solvente de eluição deve ser compatível com os métodos analíticos que se vão utilizar.

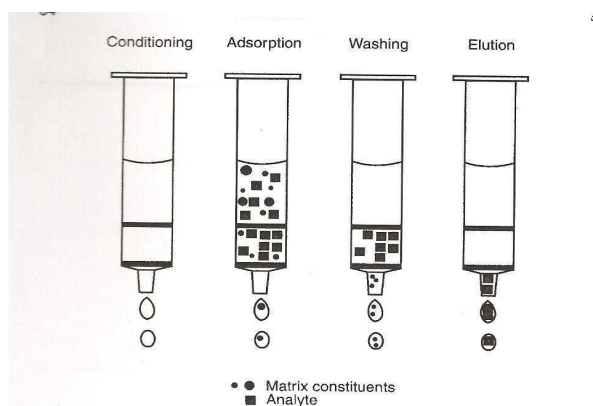


Figura 1-Procedimento de SPE (extraído de Fritz, 1999).

Tem sido usado um grande número de partículas sólidas como adsorventes de SPE para remover compostos orgânicos de amostras líquidas. As partículas de compostos ligados a sílica, como ODS sílica (octadecilsiloxano - sílica) são um dos tipos mais usados. O carvão activado e, mais recentemente, materiais de carvão grafitizado constituem outra classe de partículas sólidas usadas em SPE. Existem diferentes tipos de SPE, tendo em conta as interacções estabelecidas entre a matriz líquida e o adsorvente. Os compostos podem ser retidos no adsorvente através de um dos seguintes processos: SPE em fase reversa, SPE em fase normal e SPE em permuta iónica.

As colunas de SPE utilizadas durante o processo de extracção foram Supelclean ENVI™ Carb (Supelco), as quais são constituídas por carbono grafitico não poroso, que tem uma elevada atracção por compostos polares e não polares, de matrizes polares e não polares. A estrutura em forma de anel hexagonal e a selectividade das colunas ENVI™ Carb torna-as uma excelente alternativa quando os adsorventes ligados a sílica não permitem realizar a extracção numa determinada análise.

2.2.2. Princípios gerais de LC/MS

O LC/MS é uma técnica hifenada que combina a capacidade de separação do HPLC com o poder de detecção do espectrómetro de massa. Mesmo com um instrumento de detecção muito sofisticado, o HPLC é útil para remover as interferências da amostra que iam influenciar a ionização. O desafio neste equipamento é eliminar o solvente mantendo o nível de vácuo adequado no espectrómetro de massa e em simultâneo gerar iões em fase gasosa.

É necessária uma interface que elimina o solvente e gera iões em fase gasosa, sendo estes depois transferidos para o sistema do espectrómetro de massa. A maioria dos instrumentos recorre a uma técnica de ionização a pressão atmosférica (API), em que a eliminação do solvente e as etapas de ionização ocorrem na fonte a pressão atmosférica.

O espectrómetro de massa é o instrumento destinado a separar os iões em fase gasosa atendendo à sua razão massa carga (m/z). Por sua vez, o analisador é a peça principal deste aparelho que utiliza os campos eléctrico, ou magnético ou uma combinação de ambos para deslocar os iões da região em que são produzidos para o detector, onde produzem um sinal que é ampliado. O analisador funciona sob vácuo, de modo a que os iões possam deslocar-se para o detector com rendimento suficiente (Water Corporation, 2008).

MS/MS é a combinação de duas ou mais experiências de MS. O objectivo pode ser obter informação acerca da estrutura fragmentando os iões isolados durante a primeira experiência e/ou conseguir uma maior selectividade e sensibilidade em análises quantitativas.

MS/MS pode ser efectuado recorrendo a sistemas de analisadores acoplados (do mesmo tipo ou de tipos diferentes) ou utilizando um “ion trap” e efectuando as várias experiências dentro da “trap”.

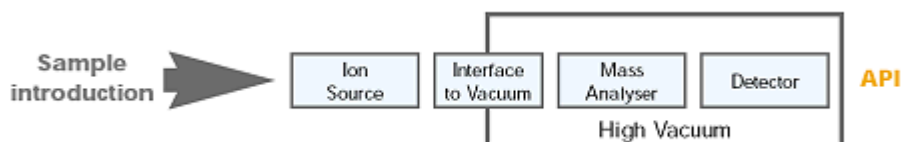


Figura 2-Esquema da estrutura do sistema de espectrometria de massa (extraído de Waters Corporation, 2008).

No passado a monitorização de pesticidas era restringida à investigação de compostos apolares que surgiam de forma persistente no ambiente, os quais eram analisados recorrendo a técnicas de análise em cromatografia gasosa (Kuster *et al*, 2008).

Com o desenvolvimento de interfaces de ionização a pressão atmosférica foram surgindo mais aplicações em LC/MS, de modo a permitir alargar a monitorização a uma gama mais alargada de compostos com propriedades mais polares. Actualmente o LC/MS é a técnica mais utilizada para a detecção e determinação de pesticidas, sendo no entanto muitas vezes necessário recorrer a LC/MS/MS para efectuar análises ambientais e evitar o aparecimento de falsos resultados positivos (Kuster *et al*, 2006).

A espectrometria de massa baseia-se na produção de iões que são separados e filtrados atendendo à sua relação massa carga (m/z) e detectados. O espectro de massa resultante corresponde a um gráfico que apresenta a abundância relativa de cada um dos iões formados em função da sua relação massa/carga. Permite obter excelente sensibilidade, que é importante para a realização de análises de compostos que se encontrem em quantidades vestigiais (Niessen, 2006).

A espectroscopia de massa pode ser efectuada principalmente em dois modos de aquisição diferentes: um em que se realizam análises em “full scan” e se faz a aquisição de massas numa gama contínua (normalmente utilizado em análises qualitativas) e outro, no qual é realizada a monitorização selectiva de iões (“selected-ion monitoring”- SIM), o qual permite fazer a pré-selecção dos iões mais abundantes, de modo a que estes sejam adquiridos (usado normalmente para proceder a análises de quantificação).

A sensibilidade da resposta obtida recorrendo a espectrometria de massa depende do tipo de interface que é utilizado. As interfaces de ionização mais utilizadas correspondem a fontes de ionização a pressão atmosférica por electrospray (ESI) e por ionização química (APCI), por sua vez os tipos de analisadores de massa utilizados dependem dos compostos em estudo. As interfaces APCI e ESI constituem a melhor escolha para a análise de pesticidas e a sua selecção deve ser efectuada atendendo aos pesticidas que estão a ser estudados.

Recorrendo a ionização por ESI e APCI (ionização suave) as moléculas são protonadas no modo de ionização positivo e desprotonadas no modo de ionização negativo, podendo ocorrer a formação de iões aductos que vão surgir no espectro de massa. A presença dos picos correspondentes aos iões aductos pode ser útil para determinar a massa molar correcta das moléculas em estudo. Por sua vez, o uso simultâneo dos modos de ionização positivo e negativo pode também facilitar a identificação de compostos em estudo. Da

ionização em modo positivo, resulta o aparecimento de uma razão massa/ carga, correspondente ao ião protonado $[M+H]^+$ e da ionização em modo negativo, resulta o aparecimento de uma razão massa carga do ião desprotonado $[M-H]^-$ para além de outros iões aductos (Tabela 2) que podem ou não surgir, dependendo das características da amostra e do tipo de ionização (Niessen, 2006).

Recorrendo à maioria dos instrumentos de LC/MS é possível alternar entre modos de ionização positivos e negativos, de modo a analisar na mesma corrida moléculas que são ionizadas em modo positivo e outras que ionizam em modo negativo.

Tabela 2- Aductos mais comuns encontrados nos modos de ionização positiva e negativa (extraído de Niessen, 2006).

Common adducts ion observed under electrospray and APCI conditions			
Positive ions		Negative ions	
<i>protonated molecule</i>		<i>deprotonated molecule</i>	
$[M+H]^+$	$M + 1$	$[M-H]^-$	$M - 1$
$[M+nH]^{n+}$	$(M + n) / n$	$[M-nH]^{n-}$	$(M - n) / n$
<i>cationized /adduct</i>		<i>anionized /adduct</i>	
$[M+NH_4]^+$	$M + 18$	$[M+HCOO]^-$	$M + 45$
$[M+Na]^+$	$M + 23$	$[M+OAc]^-$	$M + 59$
$[M+CH_3OH+H]^+$	$M + 33$	$[M+TFA]^-$	$M + 113$
$[M+K]^+$	$M + 39$	$[M+Cl]^-$	$M + 35$ ^{iso 37}
$[M+CH_3CN+H]^+$	$M + 42$		
<i>preformed ion</i>		<i>preformed ion</i>	
$M^+; [M+H]^+$	$M; M + 1$	$M^-; [M-H]^-$	$M; M - 1$

Interfaces de ionização a pressão atmosférica (API)

As interfaces/fontes de API são constituídas por 5 partes: (1) o dispositivo onde o líquido é introduzido ou “spray probe”, (2) a região da fonte de iões a pressão atmosférica, na qual os iões são gerados recorrendo a ionização por electrospray (ESI), a ionização química (APCI), entre outras, (3) uma abertura de passagem dos iões da amostra, (4) uma interface entre a zona de pressão atmosférica e a zona em que é utilizado o vácuo e um sistema óptico de iões (5), no qual estes são transportados para o analisador de massa.

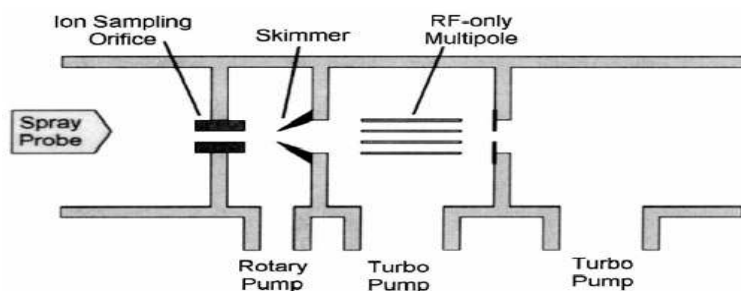


Figura 3-Esquema geral de uma interface a pressão atmosférica e fonte de íões (extraído de Niessen, 1999).

O princípio de funcionamento das interfaces de API e da fonte de íões do LC/MS pode ser sintetizado da seguinte forma. O efluente da coluna de LC é nebulizado na região da fonte de íões que se encontra à pressão atmosférica. A nebulização é efectuada de forma pneumática, como em nebulizadores aquecidos de APCI ou recorrendo à acção de um campo eléctrico forte como em ESI, podendo também resultar da combinação de ambas as metodologias (Niessen, 1999).

A partir do aerosol estabelecido, vai sendo constituída uma fase gasosa na qual ocorre a formação de íões. Estes íões, juntamente com o vapor do solvente e o gás de secagem, são deslocados pela zona de amostragem de íões para o primeiro dispositivo que se encontra sob a acção de uma bomba a qual é nesta etapa uma bomba rotativa (“rotary pump”). A mistura de gás, vapor do solvente e os íões é expandida de forma supersónica numa região de baixas pressões (10-100 Pa). O núcleo de expansão, que contém os íões e outros materiais de maior peso molecular, são amostrados pelo “skimmer” na segunda zona em que actua uma bomba, desta vez uma bomba turbomolecular (pressão entre 0,1 - 1 Pa). Nesta zona há um equipamento de transferência de íões que os desloca para a região do analisador de massa do modo mais adequado ($<10^{-3}$).

Na maior parte dos sistemas, o equipamento de transferência de íões corresponde a um sistema de RF simples, quadrupolo, hexapolo ou octapolo. Do ponto de vista do vácuo não é importante se é utilizado um fluxo elevado ou baixo de gás de nebulização, uma vez que o orifício da amostra normalmente estabelece uma restrição fixa entre a região a pressão atmosférica e a primeira etapa em que se utiliza bombas.

Os mecanismos que contribuem para a ionização dos analitos são: reacções em fase gasosa, ião-molécula e o processo de evaporação de íões (Niessen, 1999).

Mecanismos de ionização

Os mecanismos de nebulização em ionização a pressão atmosférica são diferentes quando se aplica ESI e APCI. A ionização na interface ESI é considerada uma técnica de ionização em fase líquida, na qual os iões formados em solução são dessorvidos ou evaporados para a fase gasosa e podem consequentemente ser analisados por espectrometria de massa. Por sua vez, a ionização em APCI é considerada como sendo baseada em reacções na fase gasosa, estabelecidas entre as moléculas do analito e um gás reagente que deriva do solvente, o qual é gerado através de uma série de reacções entre ião e a molécula, as quais são iniciadas por electrões resultantes da descarga de uma agulha “corona”. (Este processo de ionização não será aqui detalhado, pois não foi usado no equipamento de LC-MS disponível, podendo ser consultadas as referências Niessen, 1999 e Niessen, 2006).

O modelo de mecanismo de ESI é normalmente conhecido por “charge-residue model” ou “ion-evaporation”. Ambos os processos são iniciados com a nebulização de uma corrente líquida em pequenas gotas com carga positiva e negativa. No entanto, em electrospray apenas podem ser geradas gotas constituídas por iões com um tipo de polaridade, uma vez que as gotas de sinal contrário perdem a sua carga na superfície da agulha aquando da sua formação, como resultado da natureza electroquímica dos processos de electrospray. A carga gerada depende do tipo de electrospray realizado (Niessen, 1999).

As gotas carregadas passam por uma série de processos de preservação da carga, evaporação do solvente. Vai ocorrendo uma diminuição do tamanho das gotas, o qual é acompanhado por um aumento do campo eléctrico à superfície das gotas. A determinada altura, as repulsões de Coulomb entre as cargas superficiais excedem as forças coesivas devido à tensão superficial e as gotas rebentam (Niessen, 1999).

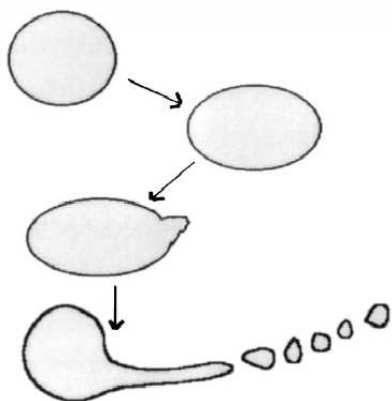


Figura 4- Representação da deformação e explosão de Coulomb resultando na produção de pequenas e micro-gotas carregadas (extraído de Niessen, 1999)

É nesta etapa final que os modelos “ion-evaporation” e o “charge-residue model” diferem. No caso do modelo “charge-residue” é assumido que as pequenas gotas contêm apenas moléculas de um analito, o qual é transferido para a fase vapor por evaporação da gota. Por outro lado, o modelo de “ion-evaporation” defende que podem ser gerados iões em fase gasosa. Estes resultam de gotas fortemente carregadas, nas quais a intensidade do campo é suficiente para permitir a emissão de iões em solução para a fase de vapor.

Estes dois mecanismos podem ser considerados complementares, uma vez que as gotas que não são suficientemente carregadas para integrarem a fase de vapor levam à formação de uma fase de vapor-ião, no caso de processos suaves de nebulização (Niessen, 1999).

Analísadores de massa

A configuração que é mais frequentemente usada nas análises de resíduos de pesticidas em água resulta da conjugação de um sistema de cromatografia líquida com analisadores de triplo quadrupolo (QqQ), os quais operam no modo monitorização em “Selected reaction monitoring” (SRM) e recorrendo a interfaces de API (Kuster *et al*, 2006).

Surgem também sistemas que apresentam uma conjugação entre interfaces API e detectores de massa “ion-trap”, que é o usado neste trabalho.

Se, por um lado, as análises quantitativas são preferencialmente realizadas em “selection reaction monitoring” (SRM) usando um quadrupolo triplo (QqQ), a utilização de API com “ion-trap” pode ser muito eficiente em análise qualitativa, sendo possível recorrer a múltiplas etapas de MS-MS, de modo a permitir identificar a presença de um determinado composto atendendo à sua estrutura.

Os quadrupolos lineares já não são considerados adequados para a detecção de vestígios de poluentes em amostras ambientais.

Para além dos sistemas de detecção de massa referidos têm vindo a ganhar alguma popularidade os métodos de instrumentação do “Q-Trap” (3-D quadrupolo-ion-trap) e os “quadrupole- time-of-flight” (Q-TOF).

Quadrupolo linear

O quadrupolo é o analisador mais amplamente utilizado devido à sua utilização fácil, à gama de massas analisada, a ter uma boa linearidade para análise qualitativa, apresentar uma boa resolução e uma boa qualidade dos espectros de massa (extraído de Waters Corporation, 2008).

Os quadrupolos lineares consistem em quatro tubos hiperbólicos ou cilíndricos que são posicionados paralelamente numa conformação radial (Niessen, 2006). Um conjunto de tubos tem um potencial eléctrico positivo e o outro negativo. É-lhes aplicado um potencial de corrente contínua (DC) e uma voltagem de corrente variável (RF). O par de tubos positivo actua como filtro para massas elevadas e o outro par como filtro para massas baixas. A resolução depende do valor de DC em relação ao RF. Uma determinada combinação das voltagens DC e RF permite que os iões com uma determinada razão massa carga (m/z) sigam uma trajectória estável e passem o quadrupolo sendo transmitidos ao detector. Os outros iões são destabilizados e chocam com os tubos.

Aumentar a resolução corresponde a fazer com que uma menor quantidade de iões alcance o detector e consequentemente influencie a sensibilidade.

O quadrupolo pode ser usado em dois modos: SIM ("single ion monitoring) ou Scan. No modo de SIM os parâmetros (DC e RF) são fixados de modo a observar unicamente uma massa específica ou uma selecção específica de massas. Este modo permite obter uma sensibilidade muito elevada.

No modo de Scan a amplitude entre as voltagens DC e RF é em rampa, de modo a obter um espectro de massa na gama de massas que inclui as massas pretendidas. A sensibilidade é função da gama de massas, da velocidade do scan e da resolução.

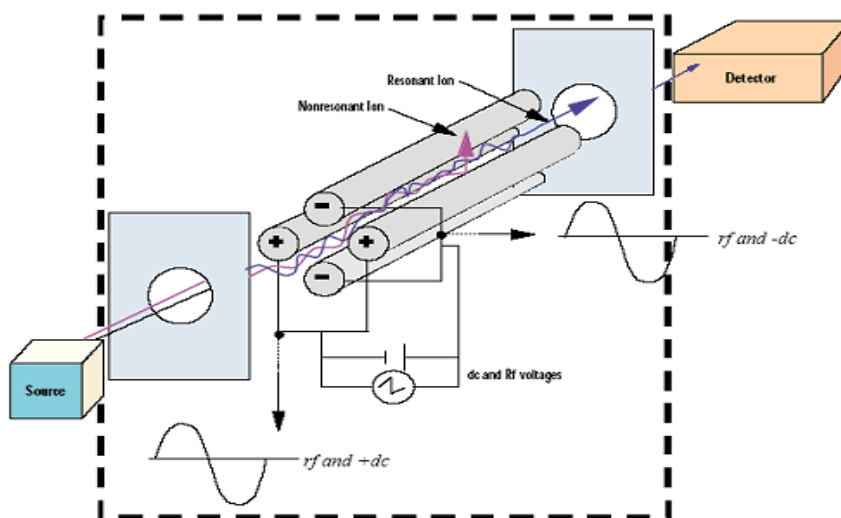


Figura 5-Quadrupolo linear (extraído de Waters Corporation, 2008).

Quadrupolo triplo

O quadrupolo triplo é o detector de massa mais versátil e aquele que é mais usado para efectuar a configuração em MS-MS.

Este analisador consiste em dois quadrupolos separados por uma célula de colisão. Tal configuração é frequentemente referida como um instrumento “tandem in space” (extraído de Waters Corporation, 2008).

Os iões percursores e iões produto são criados e analisados em diferentes espaços físicos. O primeiro quadrupolo é usado para seleccionar um primeiro ião (percursor) que é fragmentado na célula de colisão, na qual os iões são acelerados e colidem entre si na presença de um gás de colisão. Este processo é constituído por duas etapas: uma em que durante a colisão a energia resultante da deslocação do ião é convertida na sua energia interna e outra na qual ocorre a decomposição unimolecular dos iões excitados originando vários iões filhos.

A energia de colisão com o gás pode variar para permitir diferentes graus de fragmentação. Os fragmentos resultantes são analisados pelo segundo quadrupolo usando o modo SIM ou Scan. O estudo dos fragmentos de massa espectral pode fornecer informação quanto à estrutura dos analitos.

Um outro uso dos quadrupolos triplos (QqQ) é a quantificação. O primeiro analisador é usado em modo SIM, selecciona o ião pai. O segundo analisador é usado em modo SIM para monitorizar um fragmento específico.

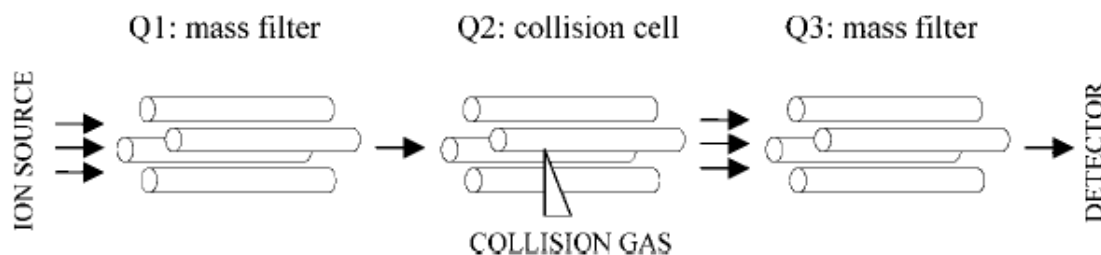


Figura 6-Ilustração de um quadrupolo triplo (extraído de Kuster *et al*, 2006).

Quadrupolo “ion-trap”

Este analisador é também conhecido como quadrupolo “ion-trap”. Foi inicialmente usado em GC/MS e depois em LC/MS.

O princípio da “trap” é armazenar iões num dispositivo constituído por um eléctrodo em anel e dois eléctrodos “end-cap”. Um dos eléctrodos “end-cap” contém furos através dos quais os electrões ou iões são introduzidos na “trap”, enquanto que outros furos são utilizados para ejectar iões da “trap” na direcção do “electron multiplier”. Os iões são introduzidos na “trap” em pulso e vão sendo armazenados. Os iões são estabilizados na “trap” através da aplicação de uma voltagem RF no eléctrodo em anel.

Para uma eficiência máxima os iões são focalizados junto do centro dos campos da “trap” e apresentam propriedades mais próximas das ideais, uma vez que são menos distorcidos, permitindo uma resolução máxima e uma maior sensibilidade. Estas condições são conseguidas através da introdução de um gás que colide com os iões e arrefece os injectados alterando as suas oscilações até que estes se tornem estáveis (Waters Corporation, 2008).

Através de variações em rampa da voltagem de RF ou através da aplicação de voltagens suplementares nos eléctrodos “end cap”, ou recorrendo a uma combinação de ambos estes factores é possível:

- destabilizar os iões e ejectá-los progressivamente da “trap”;
- manter na “trap” apenas os iões com uma determinada razão massa/carga e, de seguida ejectá-los para os observar especificamente;
- manter apenas um ião na “trap” e fragmentá-lo recorrendo a vibrações induzidas e observar os fragmentos formados (MS/MS);
- repetir a última operação várias vezes e observar os vários iões que vão sendo formados como resultado da fragmentação (MS/MSⁿ).

A resolução que é alcançável recorrendo a um “ion-trap” depende da gama de scan e da velocidade a que é efectuado. Quando se realiza o scanning acima de algumas centenas de Daltons numa fracção de segundo, a resolução é similar à que seria obtida num quadrupolo.

É no entanto possível aumentar a resolução efectuando o “scanning” com menor velocidade e reduzindo a gama de massas.

A aquisição do espectro de massa através do sistema “ion-trap” com fonte de iões externa requer um número de factores e de passos consecutivos. O número de iões que é armazenado na “trap” sem que seja afectada a resolução da massa e a precisão é limitado devido aos efeitos massa carga. É necessária uma voltagem apropriada do RF aplicado nos eléctrodos em anel para permitir captar e armazenar iões com uma razão massa/carga numa gama entre os valores de razão massa/carga limitados como superior e inferior, ou

seleccionar um determinado ião no modo SIM, sendo os restantes removidos da “trap”. Por fim, ocorre a etapa de aquisição das massas seleccionadas. (Niessen, 2006)

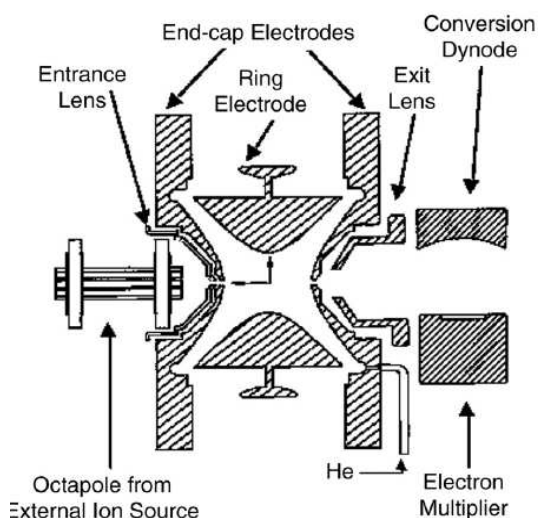


Figura 7 - Quadrupolo “ion trap” com fonte de iões externa (extraído de Niessen, 2006).

Time of Flight

Este analisador é normalmente designado por TOF. É usado em sistemas de MS recorrendo a cromatografia líquida, gasosa e a ionização MALDI.

Em MS/MS o TOF é associado a um quadrupolo ou a outro TOF (TOF-TOF) ou a um “ion-trap” (QIT/TOF).

Neste espectrómetro de massa os iões formados numa fonte de iões são extraídos e acelerados a grande velocidade devido a um campo eléctrico gerado no analisador, o qual consiste num tubo “drift” que é longo e direito. Os iões passam ao longo do tubo até atingirem o detector.

Após a fase inicial de aceleração a velocidade que é alcançada pelos iões é inversamente proporcional à raiz quadrada da sua razão massa/carga. Uma vez que a distância entre o local onde o ião é gerado e o detector é fixo, o tempo que o ião demora a chegar ao analisador numa trajectória linear é inversamente proporcional à sua velocidade e directamente proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga. Cada razão massa/carga tem determinadas características num “time-of-flight” atendendo à fonte e ao detector usados (Waters Corporation, 2008).

Os detectores correspondem ao dispositivo no qual são detectados os iões separados no analisador. É usado um de três tipos de detectores diferentes: electromultiplicadores, fotomultiplicadores de díodos e placas de microcanal.

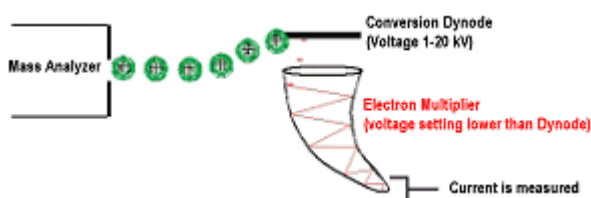


Figura 8- Electromultiplicador

(extraído de Waters Corporation, 2008).

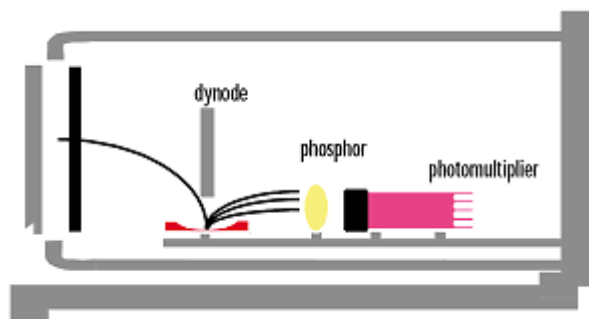


Figura 9- Fotomultiplicadores de díodos
(extraído de Waters Corporation, 2008).

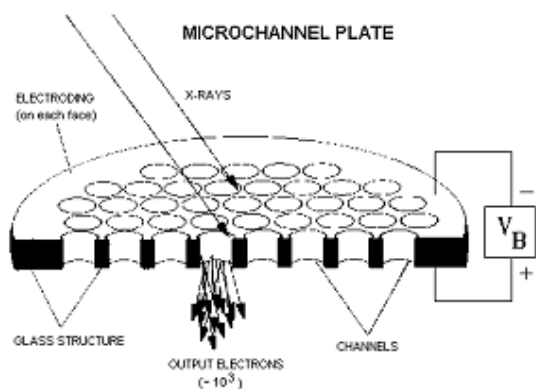


Figura 10- Placas de microcanal
(extraído de Waters Corporation, 2008).

O LC/MS utilizado neste estudo é um Varian 500-MS LC Ion Trap Mass Spectrometer, o qual corresponde a um equipamento com uma fonte de ionização a pressão atmosférica por electrospray, um “ion-trap” como analisador de massa e um detector de massa do tipo electromultiplicador.

3. Materiais e Métodos

A parte experimental deste estudo englobou: i) a etapa de extracção em fase sólida; ii) método de screening em HPLC-UV e o iii) método de confirmação em LC/MS.

3.1. Reagentes

Os solventes foram: acetona (HPLC grade, CARLO ERBA), metanol (HPLC grade, CARLO ERBA) e acetonitrilo (Lichrosolv[®] hypergrade for liquid chromatography (LC/MS), Merck). O ácido clorídrico era 37% p.a., PRONALAB e o ácido tricloroacético era p.a. ACS Merck.

A água era destilada e desionizada, excepto a usada em LC/MS, que era Lichrosolv[®] para cromatografia da Merck.

Os padrões de pesticidas eram cimoxanil (PESTANAL[®], analytical standard, 99,1%, Riedel- de-Haën), bentazona (PESTANAL[®], analytical standard, 99,1%, Riedel- de-Haën), 2,4-D (PESTANAL[®], analytical standard, 99,9%, Riedel- de-Haën), diurão (p.a., 99,5%, Chem Service).

3.2. Equipamento

Para extracção em fase sólida usaram-se colunas Supelclean[™] ENVI[™]- Carb SPE Tubes de 3 mL (0.25g). Os extractos foram evaporados à secura em dois rota-vapores, Buchi R-200 + Heating Bath B-490 e Buchi R-210 + Heating Bath B-491.

Para análise cromatográfica (HPLC-UV) usou-se um HPLC Knauer com detector Knauer Variable Wavelength e sistema de aquisição de dados Merck-Hitachi D-2500. Numa fase esporádica, que correspondeu à avaria deste equipamento, recorreu-se a um HPLC Merck com detector Merck e sistema de detecção CSW32-Chromatography Station, DataApex 2001. Também em termos de coluna cromatográfica houve necessidade de mudar de coluna a meio do trabalho, pelo que as colunas usadas foram Supersher 100 RP-18e (250x4 mm, 5 µm) e Nucleosil 100-5 C18 Macherey-Nagel (250x4 mm, 5 µm).

O LC/MS é um Varian 500-MS LC Ion Trap Mass Spectrometer equipado com uma fonte de ionização por electrospray e uma coluna Polaris C18A 5 µm, 50 x 2 mm ID. O sistema de aquisição usado foi o Varian MS Workstation versão 6.5.

3.3. Preparação de padrões

Numa fase inicial do trabalho experimental foram preparados padrões individuais de cada um dos pesticidas e de seguida uma mistura destes, retirando um determinado volume dos padrões-mãe. Estes foram preparados em etanol em balões de 100 mL, tendo sido as concentrações destes de 500 ppm para a bentazona e o cimoxanil e de 200 ppm para o diurão e para o 2,4-D.

Foram preparados padrões de mistura, os quais foram injectados no segundo HPLC referido, após terem sido detectados os tempos de retenção de cada um dos compostos em estudo. Estes três padrões de mistura em fase móvel, padrão misto 0 (MIX_0), padrão misto 1 (MIX_1) e padrão misto 2 (MIX_2), contêm as concentrações de cada um dos pesticidas que são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3-Valores de concentração dos padrões de cimoxanil (CIM), de bentazona (BEN), diurão (DIU) e 2,4-D em ppm necessários para preparar os padrões de mistura.

Padrão	MIX_0	MIX_1	MIX_2
Cimoxanil	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm
Bentazona	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm
Diurão	40 ppm	20 ppm	10 ppm
2,4-D	40 ppm	20 ppm	10 ppm

O padrão MIX_0 foi preparado num balão volumétrico de 10 mL recorrendo a microseringas. Por sua vez, os outros dois padrões foram preparados em vials de 1mL, utilizando um determinado volume do padrão MIX_0. Para preparar o padrão MIX_1 adicionou-se ao vial de 1,5 mL, 500 µL de fase móvel e 500 µL de MIX_0 com uma microseringa. Para preparar o padrão MIX_2, adicionaram-se 50 µL de MIX_0 e 500 µL de fase móvel.

Com a finalidade de efectuar a recta de calibração foram preparados 6 padrões de mistura com bentazona, cimoxanil, diurão e 2,4-D. Efectuou-se um padrão MIX_0 em água (bentazona (50 ppm), cimoxanil (50 ppm), diurão (40 ppm), 2,4-D (40 ppm)) num balão volumétrico de 25 mL e os restantes padrões foram preparados em balões volumétricos de 10 mL retirando um determinado volume do padrão MIX_0.

Os volumes de padrão MIX_0 e as concentrações dos padrões obtidos são apresentados na Tabela 4:

Tabela 4-Valores de concentração dos padrões de cimoxanil (CIM), de bentazona (BEN), diurão (DIU) e 2,4-D em ppb, assim como o volume de padrão MIX_0 que foi utilizado.

Padrão	Concentração/ppb CIM e de BEN	Concentração/ppb DIU e de 2,4-D	V (MIX_0) / μ L
P0	250	200	50
P1	500	400	100
P2	750	600	150
P3	1000	800	200
P4	2500	2000	500
P5	4000	3200	800
P6	5000	4000	1000

O padrão de mistura usado para testar os quatro métodos de extracção em fase sólida foi preparado em água num balão volumétrico de 2 L. Este apresenta uma concentração de 500 ppb de cimoxanil e bentazona e 400 ppb de diurão e 2,4-D. Foi novamente usado para efectuar a repetição dos ensaios dos vários métodos quando se fez a alteração do volume de metanol na etapa de eluição.

Antes de ser realizada a recta de calibração com padrões extraídos foi necessário preparar um novo padrão de 2,4-D. Este novo padrão foi preparado em etanol num balão volumétrico de 100 mL e apresentava uma concentração de 500 ppm.

Recorrendo aos padrões-mãe foram preparados padrões de mistura em água, os quais foram extraídos de modo a efectuar a recta de padrões extraídos.

Na tabela 5 são apresentadas as concentrações de cada um dos pesticidas no respectivo padrão de mistura, assim como os volumes retirados dos padrões-mãe e o volume dos balões volumétricos utilizados para a preparação dos mesmos. Os padrões de 1 a 7 foram preparados em balões volumétricos de 250 mL e os restantes foram preparados em balões volumétricos de 100 mL.

Tabela 5-Valores de concentração de cada um dos pesticidas em cada padrão de mistura (Cf), assim como o volume de padrão-mãe utilizado para preparar o padrão (Vret).

Padrão	Cimoxanil Cf(ppm)	Vret(μL)	Bentazona Cf(ppm)	Vret(μL)	2,4-D Cf(ppm)	Vret(μL)	Diurão Cf(ppm)	Vret(μL)
P1	0,05	25	0,05	25	0,2	100	0,06	75
P2	0,1	50	0,1	50	0,3	150	0,1	125
P3	0,15	75	0,5	250	0,4	200	0,2	250
P4	0,2	100	0,6	300	0,6	300	0,3	375
P5	0,3	150	1,0	500	0,8	400	0,4	500
P6	0,4	200	1,25	625	1,2	600	0,6	750
P7	0,5	250	2,5	1250	1,4	700	0,8	1000
P8	0,3	60	1,0	200	2,5	500	0,4	200
P9	0,4	80	1,25	250	5,0	1000	0,6	300
P10	0,5	100	2,5	500	10	2000	0,8	400
P11	0,3	60	1	200	1	200	1	500
P12	0,4	80	1,3	260	1,3	260	1,3	650
P13	0,5	100	2,5	500	2,5	500	2,5	1250

3.4. Extracção por SPE

As condições de extracção foram optimizadas, tendo-se obtido as condições que são apresentadas na figura seguinte.

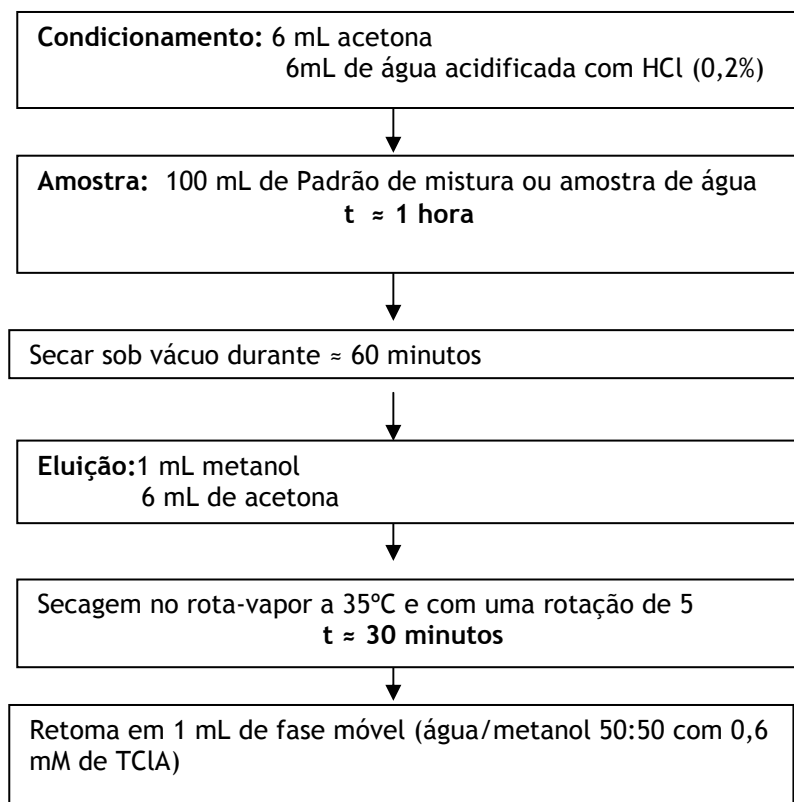


Figura 11-Procedimento de SPE utilizado.

3.5. Análise por HPLC-UV

A fase móvel era água/metanol 50:50 com 0,6 mM de TClA, o fluxo de 1 mL/min e trabalhou-se em condições isocráticas. A análise foi realizada à temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 µL e um comprimento de onda de detecção de 230 nm. O sistema de aquisição de dados funcionou com velocidade do papel 2,5 mm/min e atenuação 4x.

As fases móveis utilizadas ao longo dos procedimentos experimentais eram filtradas sob vácuo e de seguida desgaseificadas durante 12 minutos com ultrasons.

3.6. Análise por LC/MS

Utilizou-se uma fase móvel água/acetonitrilo, um fluxo de 0,2 mL/min e operou-se em modo gradiente, sendo as condições apresentadas na tabela 6. Por sua vez, as condições operatórias optimizadas para cada um dos compostos encontram-se na tabela 7. O volume de injeção foi de 10 µL.

Tabela 6-Descrição das condições operatórias por LC/MS em que a água é o solvente A e o acetonitrilo, o solvente B.

Tempo/(min)	%A	%B
0,00	0	100
1,23	0	100
1,50	40	60
2,25	40	60
2,50	0	100
3,00	0	100

Tabela 7-Descrição das condições de aquisição de dados em LC/MS

Parâmetros MS	CIM	BEN	2,4-D	DIU
Modo de Ionização	positivo	negativo	negativo	positivo
Gás de Nebulização (psi)	25	55	52	30
Gás de Secagem				
• Pressão (psi)	10	30	19	25
• Temperatura (° C)	350	330	250	350
Voltagem da agulha (V)	5500	4000	3500	5000
Voltagem do Escudo (V)	600	600	600	600
Voltagem do Capilar (V)	50	55	30	40
<i>RF loading</i> (%)	63	51	100	72
Parâmetros MS/MS				
Ião Percursor (m/z)	199, 221	239	219	233,235
Ião Produto (m/z)	171,182, 128	197,175,1 32	161	72,16
Amplitude de Excitação	1,10 V	0,68 V	0,72 V	0,64 V

4. Resultados e Discussão

Para obter as condições finais descritas em Materiais e Métodos, foi necessário recorrer a sucessivos ensaios de optimização, que envolveram a definição da fase móvel mais adequada para HPLC, a definição das melhores condições de extracção e a definição das condições de funcionamento de LC/MS.

Posteriormente procedeu-se à validação da metodologia analítica que envolve duas etapas, a de “screening” por HPLC-UV e a de confirmação por LC/MS.

4.1. Optimização das condições operatórias

4.1.1. Optimização da fase móvel para HPLC-UV

Ao longo da realização deste trabalho pretendia-se determinar um método multi-resíduo que permitisse detectar a presença de vários pesticidas polares com diferentes características físico-químicas. Com essa finalidade optimizaram-se condições de cromatografia líquida como a composição da fase móvel e o comprimento de onda.

Com o intuito de determinar as melhores condições a utilizar realizaram-se injeções individuais de cada um dos padrões dos pesticidas em estudo mantendo a fase móvel e o comprimento de onda. Foi assim possível determinar o tempo de retenção correspondente a cada composto.

Tendo como base as condições experimentais descritas por Taguchi *et al* (1998) preparou-se uma fase móvel composta por 7% de metanol, 93% de água e com 25 mM de ácido tricloroacético (TClA). Esta fase móvel apresenta um pH próximo de 1,5 tendo sido injectados padrões dos compostos em estudo, na concentração de 5 mg/L com um fluxo de 1,0 mL/min e um comprimento de onda de 275 nm. Não foi possível detectar nenhum pico em nenhum dos cromatogramas, fazendo supor que ou a concentração era baixa (abaixo do limite de detecção) ou o comprimento de onda de análise não era o mais adequado. Aliás este é um dos problemas de análise multiresíduo, pois cada um dos compostos absorve radiação num comprimento de onda óptimo diferente e há que encontrar uma situação de compromisso.

Foi preparada uma nova fase móvel composta por 90% de água, 10% de Metanol e 6 mM de TClA, mas mesmo assim não foi possível detectar 2,4-D.

Testou-se o efeito da alteração do comprimento de onda na resposta do padrão de 2,4-D, tendo sido o padrão de 50 mg/L injectado com um comprimento de onda de 275 e 250 nm, mantendo o fluxo de 1,0 mL/min, no entanto não se conseguiu detectar o composto.

Foi preparada uma nova fase móvel com 3mM de TClA e o pH obtido foi de cerca de 2,50. Alterou-se o comprimento de onda para 245 nm. Realizou-se a injeção do padrões de cimoxanil e de diurão de 100 mg/L, tendo sido detectados nos cromatogramas picos que podem corresponder a estes compostos. Não foi possível obter um pico correspondente ao 2,4-D após a injeção de padrões deste pesticida em diferentes concentrações.

Testaram-se outras fases móveis com a mesma concentração de TClA, com as proporções de 70:30 e 80:20 de água:metanol. Com estas fases móveis não foi possível detectar numa corrida todos os picos correspondentes aos compostos em estudo.

A dificuldade de detecção parecia residir mais na diferente polaridade dos compostos em estudo, bem como no comprimento de onda utilizado.

Decidiu-se recorrer a uma fase móvel constituída por metanol e água (50:50) e 3 mM de TClA, com um pH próximo de 2, fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 245 nm. Injectaram-se padrões individuais de bentazona (100 ppm), 2,4-D (200 ppm em etanol), diurão (100 ppm) e cimoxanil (500 ppm), tendo-se recorrido a um HPLC diferente do utilizado na validação por avaria do mesmo. Foi possível detectar os picos correspondentes a cada um dos pesticidas em estudo (Figura 12).

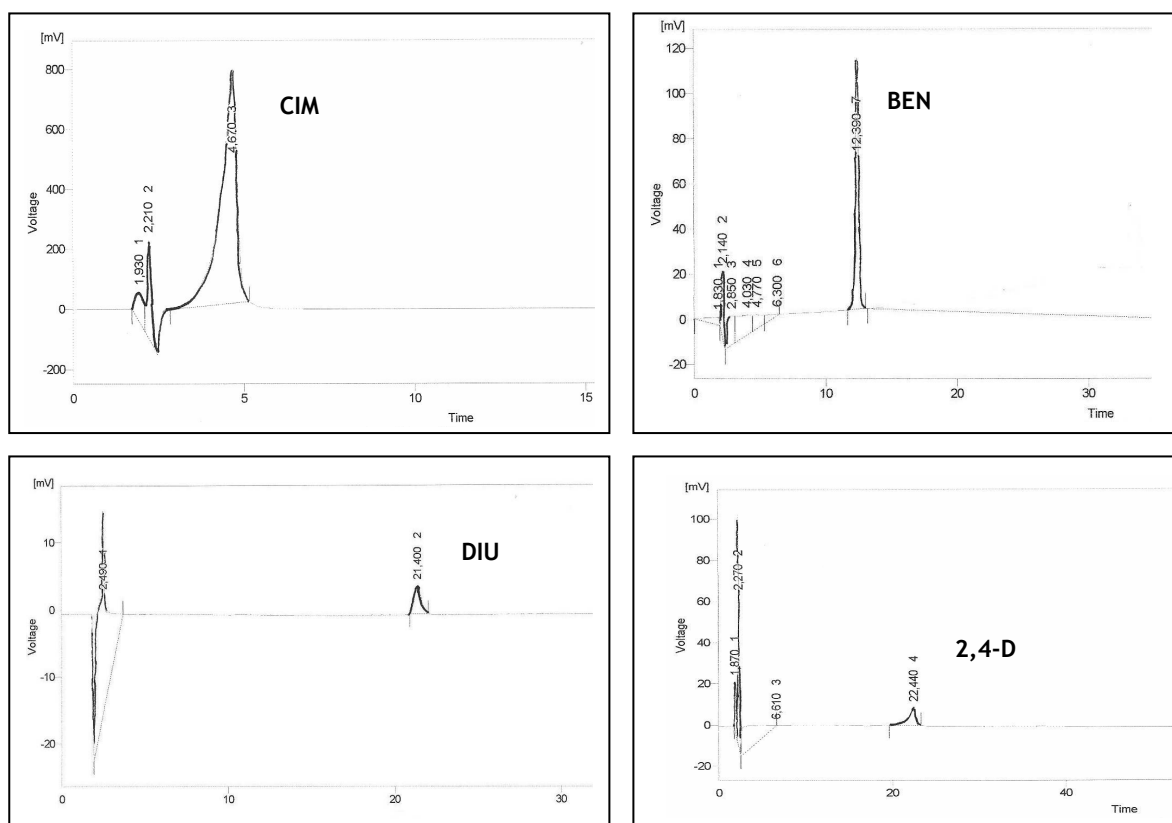


Figura 12-Cromatogramas dos 4 pesticidas em estudo obtidos por injeção de padrões individuais com concentrações de 100 ppm para a bentazona e diurão, 500 ppm para o cimoxanil e 200 ppm para o 2,4-D recorrendo a um fluxo de 1,0 mL/min e $\lambda=245$ nm.

De seguida procurou-se otimizar o comprimento de onda de absorção, usando uma solução contendo bentazona (20 ppm), cimoxanil (125 ppm), diurão (60 ppm) e 2,4-D (40 ppm). Esta solução foi injectada em duplicado para os comprimentos de onda de 245 nm, 230 e 260 nm. É possível identificar os picos associados a cada um dos pesticidas recorrendo a cada um dos comprimentos de onda utilizados, no entanto, apenas com o comprimento de onda de 230 nm é possível distinguir completamente os picos do diurão e do 2,4-D, uma vez que os tempos de retenção associados a estes compostos são muito próximos (Figura 13).

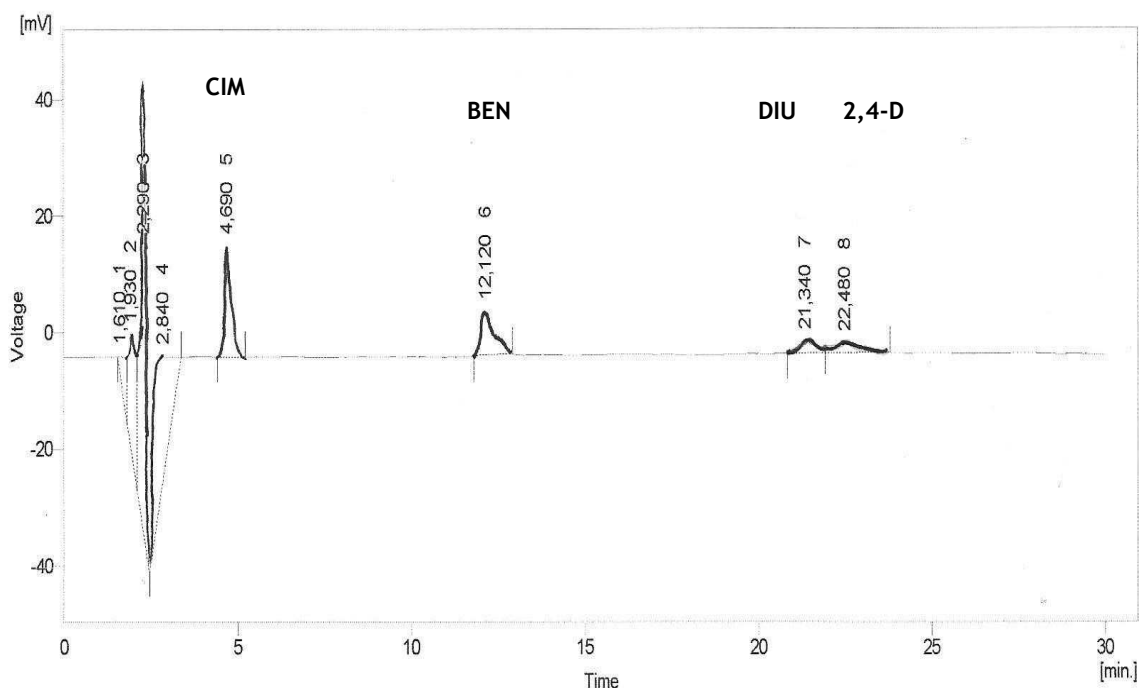


Figura 13-Cromatograma dos 4 pesticidas em estudo obtido por injeção de um padrão de mistura com bentazona (20 ppm), cimoxanil (125 ppm), diurão (60 ppm) e 2,4-D (40 ppm) usando um fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min e um comprimento de onda de 230 nm.

Atendendo aos resultados que foram sendo obtidos a fase móvel final corresponde a uma mistura de água e metanol 50:50 e 0,6 mM TClA, com um comprimento de onda de detecção de 230 nm.

O agente acidificante usado (TClA) permitiu recorrer a uma fase móvel com um pH mais baixo e identificar picos definidos correspondentes a cada um dos compostos em estudo, no entanto este composto é bastante agressivo, havendo um compromisso entre a resolução dos picos dos compostos em estudo e o tempo de vida do equipamento, em particular vedantes e material mais sensível.

4.1.2. Optimização das condições de extracção por SPE

Na etapa de extracção fase sólida recorreu-se ao uso de colunas Envi Carb de 3 mL (0,25g) e testaram-se várias condições de extracção. O método seleccionado teve como base um documento técnico intitulado: “Extract Nonvolatile Pesticides from drinking water, using a graphitized carbon adsorbent” (Supelco, 1997).

Foram efectuados 3 ensaios de extracção nas condições descritas na Figura 14, não foi possível extrair todos os pesticidas.

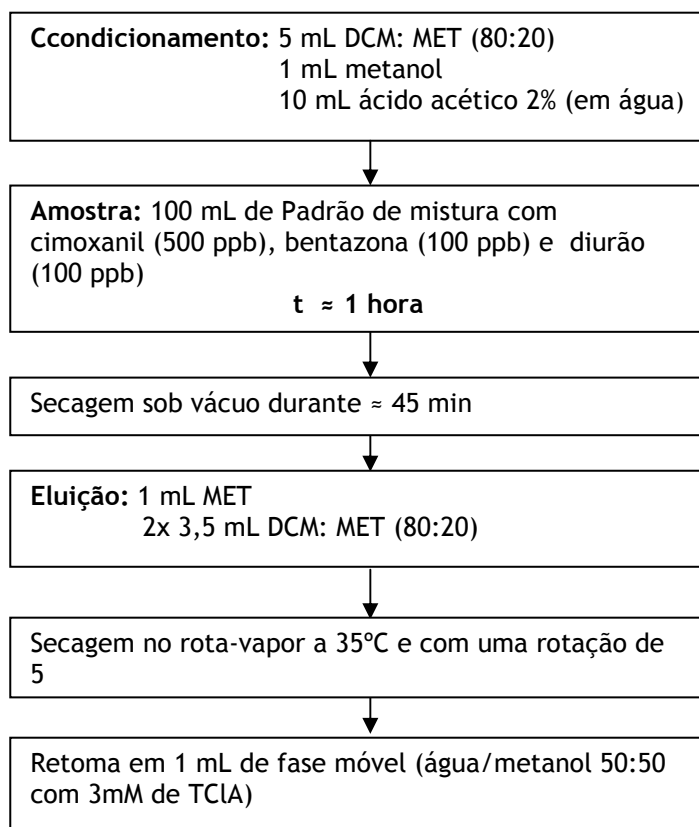


Figura 14-Esquema que apresenta o procedimento de SPE anteriormente referido.

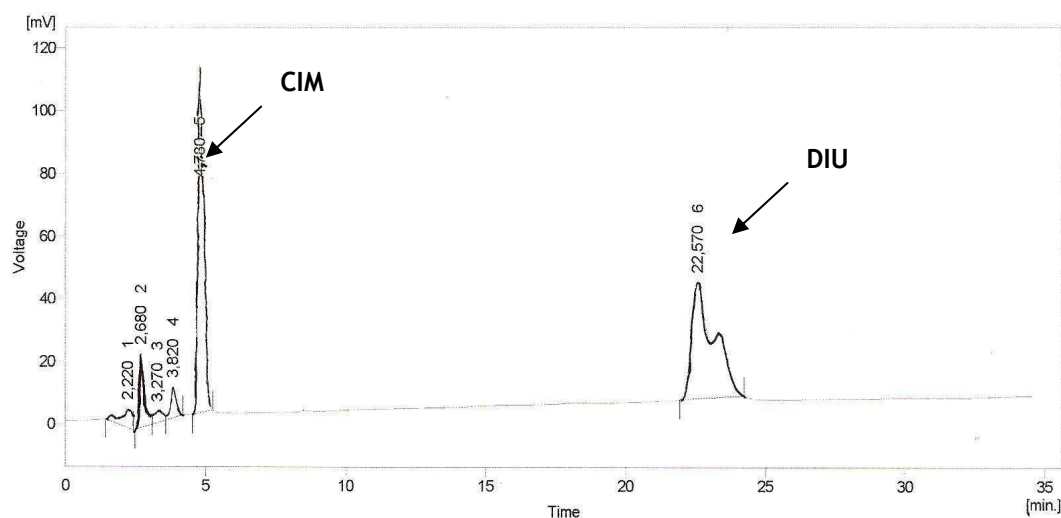


Figura 15-Cromatograma de um extracto recorrendo à metodologia apresentada na figura 14.

Procedeu-se de seguida à alteração das condições de condicionamento e de eluição, tentando encontrar uma solução de compromisso que atende às compatibilidades diferentes dos pesticidas em estudo com os solventes de extracção (Tabela 8).

Tabela 8-Condições de extracção por SPE (A, B, C e D)

A	B	C	D
Condicionamento	Condicionamento	Condicionamento	Condicionamento
2 vol. DCM:MET (80:20) 2 vol. água com ácido acético	2 vol. Acetona 2 vol. de água com ácido acético	2 vol. Acetona 2 vol. de água com ácido clorídrico	2 vol. : 40 DCM 40 Acet. 20 Met 2 vol. de água com ácido clorídrico
Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
100 mL de padrão	100 mL de padrão	100 mL de padrão	100 mL de padrão
Eluição	Eluição	Eluição	Eluição
1 vol. de metanol 2 vol. DCM:MET (80:20)	1 vol. de metanol 2 vol. de acetona	1 vol. de metanol 2 vol. de acetona	1 vol. de metanol 2 vol. : 40 DCM 40 Acet. 20 Met

A etapa correspondente à passagem de amostra na coluna dura cerca de 45 minutos e após ter sido efectuada a eluição a amostra era evaporada num rota-vapor a 35°C sob vácuo. As amostras demoravam muito tempo a secar principalmente nas condições A e D, porque continham maior volume de metanol.

Repetiram-se os ensaios com os 4 métodos descritos na tabela 8, diminuindo o volume de metanol na etapa de eluição para 1 mL, o que provocou uma diminuição do tempo da etapa de secagem das amostras. O método de SPE escolhido foi o C. Nestas condições apresenta-se um cromatograma correspondente à extracção de uma mistura padrão.

Durante a realização deste trabalho houve necessidade de substituir a coluna cromatográfica. Assim, apesar de ambas apresentarem características semelhantes o facto de apenas a primeira ser encapada fez com que ocorresse a alteração da ordem de eluição do diurão e do 2,4-D devido a apresentarem polaridades semelhantes. Como se pode verificar pela figura 15 na qual é apresentada a mistura dos pesticidas, o diurão tem menor tempo de retenção do que o 2,4-D (1ª coluna) e na figura 16 apresentada abaixo a ordem inverteu-se (2ª coluna).

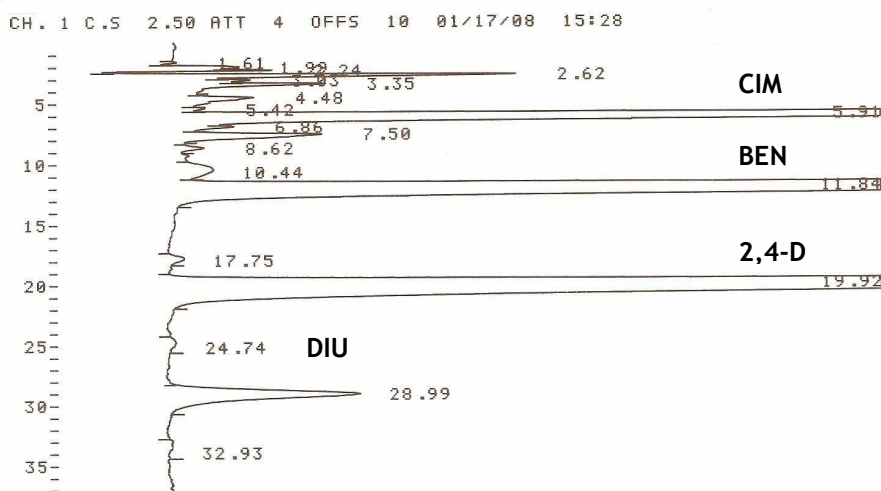


Figura 16-Cromatograma de um padrão de cimoxanil 500 ppb, bentazona 2500 ppb, 2,4-D 1400 ppb e diurão 800 ppb extraído nas condições do método C utilizando a coluna Nucleosil da Macherey-Nagel.

4.1.3. Validação do procedimento analítico de “screening” por SPE-HPLC-UV

Os parâmetros de validação do método analítico que engloba o procedimento de extracção por SPE e de análise cromatográfica por HPLC-UV compreenderam o estudo da linearidade, com padrões por injeção directa e por injeção de padrões extraídos, a precisão referente a extracções independentes de padrões analíticos, a exactidão obtida por comparação da concentração obtida com a concentração esperada para padrões analíticos no mesmo nível e em diferentes níveis. Finalmente estimou-se a incerteza global com base nos parâmetros de validação.

Relativamente ao estudo da linearidade com injeção directa de padrão, este serve unicamente para avaliar se a resposta do detector é linear numa determinada gama, pois as rectas de calibração assim obtidas não são usadas na quantificação nem na estimativa da incerteza.

As rectas obtidas por injeção directa de padrões de mistura nas concentrações definidas na tabela 4 de Material e Métodos encontram-se na Figura 17. Os dados correspondentes encontram-se em Anexo A.

Conclui-se que os coeficientes de correlação se encontram acima de 0,995 e que o erro relativo do declive é 1% para o cimoxanil e a bentazona e 13% e 14% para o 2,4-D e o diurão, respectivamente. Os limites de detecção nestas condições são 60 ppb, 40 ppb, 1060 ppb e 1090 ppb, para o cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente.

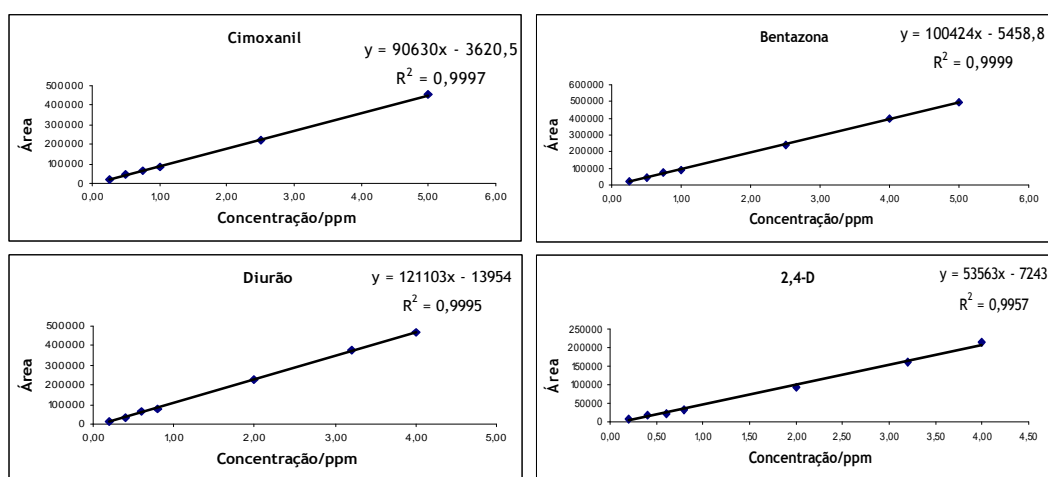


Figura 17-Rectas de calibração obtidas para cada um dos pesticidas por injeção directa de padrões de mistura.

O processo de quantificação não utiliza a recta de calibração com injeção directa de padrões porque se verifica que a percentagem de extracção é relativamente baixa para alguns dos compostos. Nestes casos, se existir linearidade em termos da resposta do detector em função de padrões extraídos, é recomendável usar preferencialmente as rectas de calibração correspondentes. Na Figura 18, apresentam-se as rectas de calibração obtidas com padrões extraídos, cujos dados correspondentes se encontram no Anexo B.

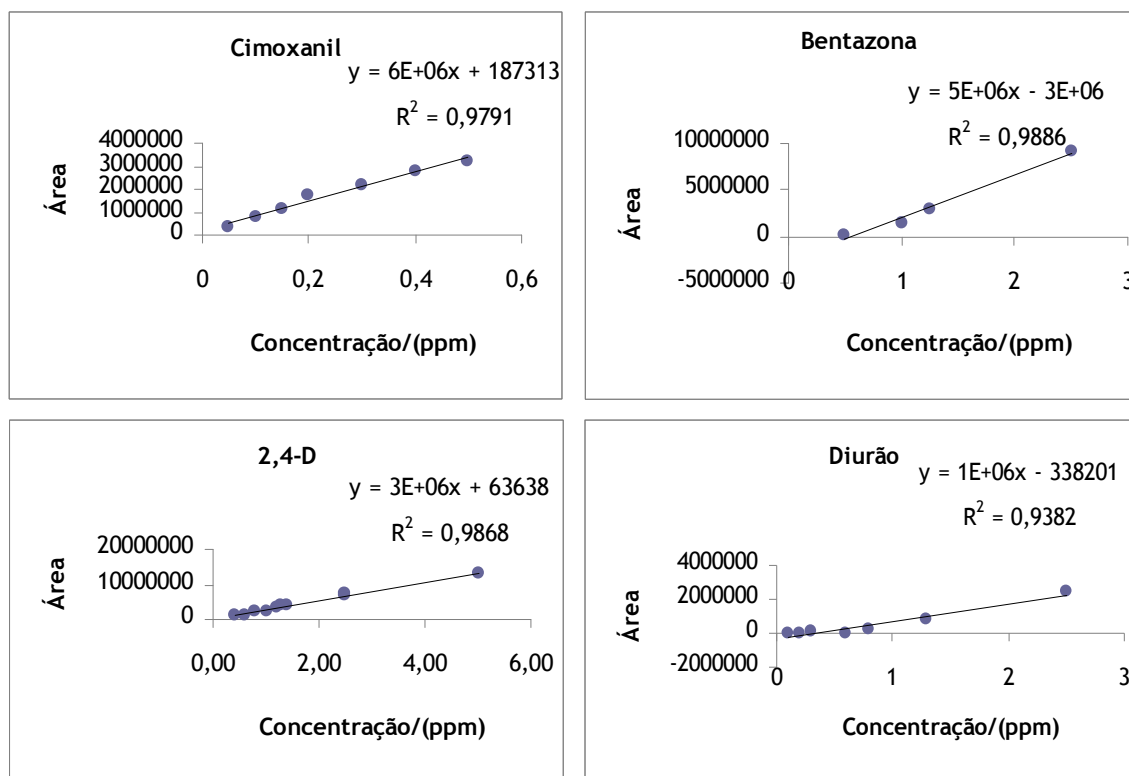


Figura 18-Rectas de calibração obtidas para cada um dos pesticidas por injeção de padrões extraídos.

Comparando a resposta em termos de área do pico cromatográfico com a resposta obtida por injeção directa, é possível calcular a eficiência de extracção, considerando o factor de concentração, uma vez que as amostras são concentradas 100x. As eficiências de extracção foram 80,6%, 19,6%, 49,5% e 2,87% para cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente. Como se comprova são eficiências, à excepção do cimoxanil, suficientemente baixas, para justificar a utilização de rectas de calibração com padrões extraídos.

Os limites de detecção recorrendo a padrões extraídos são de 70 ppb, 39 ppb, 420 ppb e 470 ppb, para o cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente.

Relativamente ao estudo da precisão este foi realizado com concentrações de padrões em níveis mais altos da recta de calibração, nomeadamente 0,4 mg/L para o cimoxanil e 1,2 mg/L para os restantes, tendo sido efectuadas 8 extracções do mesmo padrão. Quantificou-se o coeficiente de variação respectivo.

Para os ensaios de exactidão, quantificou-se a percentagem de recuperação resultante, quer dos ensaios de precisão (o mesmo padrão) quer de ensaios a 3 níveis diferentes.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9 e os dados experimentais correspondentes aos ensaios de precisão estão no Anexo C.

Tabela 9-Valores de concentração, número de ensaios, recuperação média (% R média) e o coeficiente de variação em percentagem para ensaios a um nível de concentração (precisão/exactidão) e a níveis de concentração diferentes.

Composto	Concentração (ppm)	nº de ensaios	% R média	CV%
Ensaio ao mesmo nível de concentração				
Cimoxanil	0,4	8	90,1	11,6
Bentazona	1,2	8	52,1	9,8
2,4-D	1,2	8	88,0	19,6
Diurão	1,2	8	91,6	65,4
Ensaio a níveis de concentração diferentes				
Cimoxanil	0,3	1	67,1	-
	0,4		92,5	
	0,5		84,6	
Bentazona	1,0	1	51,5	-
	1,3		56,1	
	2,5		81,9	
2,4-D	1,0	1	83,2	-
	1,3		94,5	
	2,5		94,1	
Diurão	1,0	1	14,6	-
	1,3		83,9	
	2,5		114,8	

Os valores obtidos para a precisão da bentazona e do cimoxanil encontram-se próximos de 10%, sendo estes bastantes bons no que diz respeito à sua precisão e exactidão. Por sua vez, o valor da percentagem do coeficiente de variação para o 2,4-D é mais elevado, no

entanto, por não ser superior a 20%, os valores podem ser considerados como aceitáveis a nível de precisão e exactidão. O valor obtido para o diurão é de 65,4% o que indica que os resultados obtidos para este composto apresentam uma baixa precisão e exactidão.

Como se pode verificar avaliando os valores de exactidão a vários níveis de concentração e comparando-os com os valores de % de recuperação obtidos para um nível de concentração é possível verificar que, para a concentração mais próxima os valores de recuperação apresentam valores próximos para o cimoxanil e para a bentazona, o mesmo não acontecendo com o diurão e o 2,4-D que apresentam um coeficiente de variação mais elevado.

4.1.4. Estimativa da incerteza analítica do método de “screening” por SPE-HPLC-UV

O processo de estimativa da incerteza seguiu o procedimento de cálculo descrito por Ratola *et al* (2004), que teve como base a metodologia adoptada no guia da Eurachem/CITAC (2000). Este estudo representa uma medida da variabilidade e fiabilidade do método analítico. Combina as contribuições das várias fontes de erro e permite interpretar e diagnosticar as fontes de erro que influenciam mais os resultados.

Consideraram-se 4 fontes essenciais de incerteza: a incerteza associada à preparação dos padrões (u_{pp}), a incerteza associada às rectas de calibração (u_{x0}) e as incertezas relativas aos cálculos de precisão (u_p) e exactidão (u_e).

Contabilizando a influência de cada uma destas fontes de erro é calculado um coeficiente de incerteza global (U_{global}). As equações utilizadas para efectuar este procedimento são apresentadas no Anexo E.

Nas tabelas de 10 a 13 são apresentadas as incertezas relativas associadas às fontes consideradas, assim como o valor do coeficiente global e do coeficiente médio para cada um dos pesticidas em estudo. Como se pode verificar pelas tabelas 10 a 13 os valores de coeficiente de incerteza global médio são de 10,8%, 21,8%, 55,8% e 34,5% para o cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente. No caso do cimoxanil e do diurão a incerteza que influencia mais o coeficiente global é a da exactidão. Por outro lado, a incerteza que afecta mais os valores dos coeficientes globais para a bentazona e o 2,4-D corresponde à incerteza associada à preparação dos padrões.

Tabela 10-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o cimoxanil.

u_{pp}	u_{x0}	u_e	u_p	U global
0,01026	0,04066	0,09191	0,04103	0,1090
0,01026	0,03803	0,09191	0,04103	0,1081
0,01026	0,03679	0,09191	0,04103	0,1077
0,01026	0,03577	0,09191	0,04103	0,1073
0,01026	0,03631	0,09191	0,04103	0,1075
0,01029	0,03846	0,09191	0,04103	0,1082
0,01029	0,04120	0,09191	0,04103	0,1092
Um_{global}				0,1082
10,8%				

Tabela 11-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o bentazona.

u_{pp}	u_{x0}	u_e	u_p	U global
0,01025	0,1526	0,1500	0,03466	0,2170
0,01028	0,1455	0,1500	0,03466	0,2121
0,01028	0,1417	0,1500	0,03466	0,2095
0,01028	0,1725	0,1500	0,03466	0,2315
Um_{global}				0,2175
21,8%				

Tabela 12-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o 2,4-D.

u_{pp}	u_{x0}	u_e	u_p	U global
0,01026	0,3276	0,04083	0,06935	0,3375
0,01026	0,3292	0,04083	0,06935	0,3391
0,01026	0,3223	0,04083	0,06935	0,3324
0,01025	0,3183	0,04083	0,06935	0,3285
0,01025	0,3176	0,04083	0,06935	0,3278
0,01029	0,3251	0,04083	0,06935	0,3351
0,01029	0,3778	0,04083	0,06935	0,3864
0,01029	0,3207	0,04083	0,06935	0,3308
0,01029	0,3176	0,04083	0,06935	0,3278
0,01029	0,3235	0,04083	0,06935	0,3335
Um_{global}				0,3448
34,5%				

Tabela 13-Valores obtidos para as incertezas associadas a cada uma das fontes e os valores dos coeficientes globais e o coeficiente global médio para o diurão.

u_{pp}	u_{x0}	u_e	u_p	U global
0,01120	0,2781	0,4167	0,2313	0,5519
0,01120	0,2784	0,4167	0,2313	0,5521
0,01120	0,2763	0,4167	0,2313	0,5510
0,01123	0,2774	0,4167	0,2313	0,5515
0,01123	0,2732	0,4167	0,2313	0,5495
0,01123	0,2732	0,4167	0,2313	0,5495
0,01123	0,3619	0,4167	0,2313	0,5985
Um_{global}				0,5577
55,8%				

Recorrendo a este método de SPE-HPLC-UV não é possível identificar de modo inequívoco as substâncias em estudo, uma vez que podem existir interferentes na amostra, sendo nessas circunstâncias obtidos falsos resultados positivos. Surge assim a necessidade de recorrer a análises em LC/MS como etapa de confirmação. No entanto, o método de “screening” corresponde a um passo importante, uma vez que permite realizar a análise de um grande número de amostras e a identificação das que possam conter os pesticidas em estudo, sendo estas posteriormente analisadas em LC/MS. Recorrendo a SPE-HPLC-UV é possível analisar um grande número de amostras de um modo mais rápido e com menos encargos.

4.1.5. Optimização das condições em LC/MS

Deve salientar-se que o equipamento de LC/MS adquirido pelo LEPAE, laboratório de investigação onde este trabalho foi realizado, apenas foi montado na fase final deste trabalho. Houve assim necessidade de frequentar uma acção de formação interna, para aquisição dos procedimentos iniciais de arranque do equipamento.

Para se obter resultados recorrendo a LC/MS é necessário efectuar uma optimização dos parâmetros relativos à fonte de ionização. É assim possível assegurar uma máxima formação de iões, obter um transporte eficiente do ião analito da fase aquosa para a fase gasosa e para o capilar e minimizar os interferentes. Deste modo, a optimização foi realizada para cada um dos pesticidas individualmente recorrendo a injeção directa dos padrões preparados em acetonitrilo. Foram também injectados extractos de mistura dos pesticidas em estudo retomados em acetonitrilo.

Na imagem seguinte é apresentado o LC/MS utilizado neste estudo, sendo indicada na figura a constituição do mesmo. O “Varian 500-MS LC Ion Trap Mass Spectrometer” corresponde a um equipamento com uma fonte de ionização por electrospray, um “ion-trap” como analisador de massa e um detector de massa do tipo electromultiplicador.

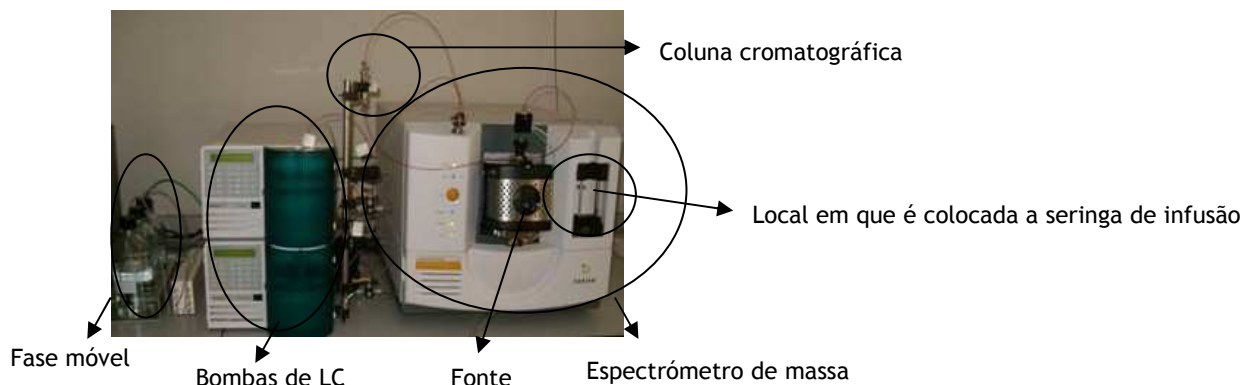


Figura 19-Fotografia do LC/MS utilizado.

É apresentado de seguida (Figura 20) um esquema em corte do espectrómetro de massa de modo a ser mais simples perceber a sua constituição, assim como os parâmetros que são optimizados durante esta etapa de detecção cromatográfica. Em 1 é apresentada a parte externa da agulha com os respectivos parafusos de ajuste do eixo dos x e dos y, os quais permitem maximizar a resposta. O dispositivo apresentado em 2 apenas existe quando o equipamento contém uma interface de APCI. Por sua vez, em 3 está representado o capilar e com o número 4 são apresentados o skimmer e o guia de iões em hexopolo, os quais permitem maximizar a transmissão de iões para o detector. Por fim com o número 5 é apresentada a fonte de ionização.

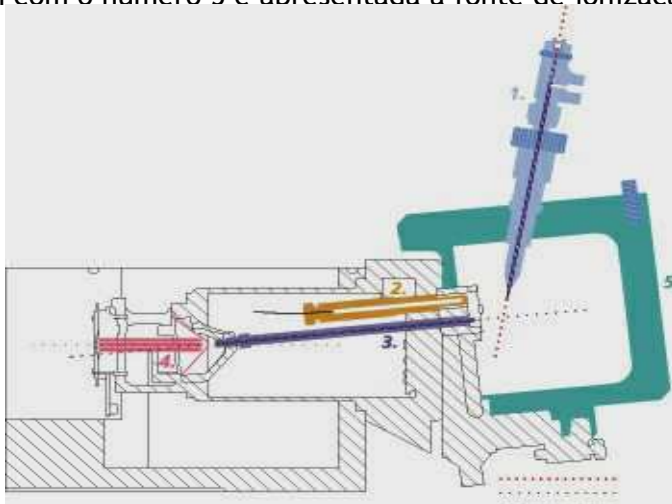


Figura 20-Representação em corte do espectrómetro de massa (extraído de Varian, 2007).

De modo a realizar os ensaios em LC/MS é necessário efectuar primeiro a optimização para cada um dos padrões realizando a injeção do padrão no detector de massa utilizando a seringa de infusão. Recorrendo à injeção na massa e após ter sido efectuado o ajuste da agulha é possível determinar os parâmetros óptimos no que diz respeito à voltagem do capilar, do RF e da voltagem da agulha para uma gama de massas e tendo em conta o ião precursor. Após terem sido determinados estes parâmetros são efectuados segmentos em AMD (automated mass development), de modo a encontrar o valor da amplitude de excitação. Esta permite obter uma melhor ionização, ou seja, obter um pico máximo referente ao ião filho, mas que apresente ainda um pico correspondente ao ião precursor. Utilizando todos os parâmetros determinados é necessário realizar também segmentos para encontrar os valores da temperatura e pressão do gás de secagem e a pressão do gás de nebulização que permitem melhores resultados.

Com todos os parâmetros optimizados pode ser realizada uma corrida em MS na gama de massa pretendida para verificar a resposta obtida.

Após terem sido realizados todos os ensaios de optimização é possível fazer ensaios de LC/MS e LC/MS/MS.

É então necessário realizar a purga dos canais de cada uma das bombas e depois de ser definido o programa de eluição realizar os ensaios. É normalmente necessário realizar pequenos ajustes dos parâmetros de modo a obter melhores resultados. Normalmente os parâmetros que influenciam mais a resposta são a temperatura do gás de secagem e a voltagem do capilar.

Realizando as etapas anteriormente mencionadas foi possível obter os parâmetros optimizados para cada um dos compostos em estudo, tal como é apresentado na tabela 7 de Materiais e Métodos.

Foram realizados ensaios de injeção directa de padrões individuais de cada um dos pesticidas em estudo. Foi assim possível identificar os picos associados a cada um dos compostos e determinar as condições óptimas. Para os padrões individuais foi possível identificar a bentazona utilizando um padrão de 1 ppm e para o cimoxanil e diurão foi necessário recorrer a uma concentração de 5 ppm em acetonitrilo. De modo a ser possível identificar o 2,4-D foi necessário utilizar concentrações muito elevadas.

Após ter sido realizada a optimização com padrões individuais foi efectuada a injeção de padrões extraídos por SPE segundo o método anteriormente descrito e retomados em acetonitrilo. Recorrendo ao uso dos padrões de mistura extraídos foi possível identificar picos correspondentes à bentazona e ao cimoxanil. Neste momento foi assim possível identificar bentazona e cimoxanil, recorrendo simultaneamente a injeção directa e a injeção de padrões extraídos.

Nas figuras seguintes são apresentados cromatogramas obtidos para a bentazona e o cimoxanil em LC/MS para injeção directa, assim como o espectro de massa correspondente e os cromatogramas obtidos em LC/M/MS para a injeção de padrões extraídos e o espectro de massa correspondente.

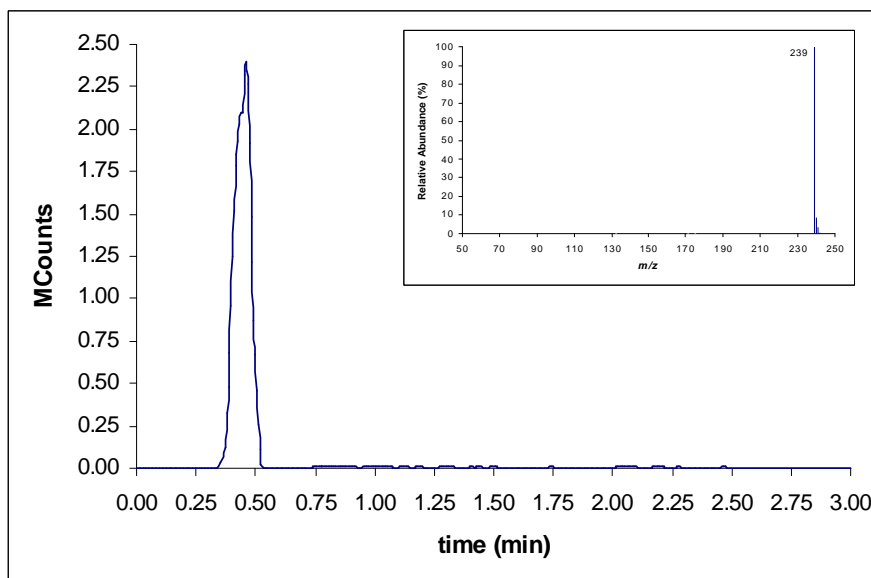


Figura 21-Cromatograma obtido por injeção directa de um padrão de bentazona de 1 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS

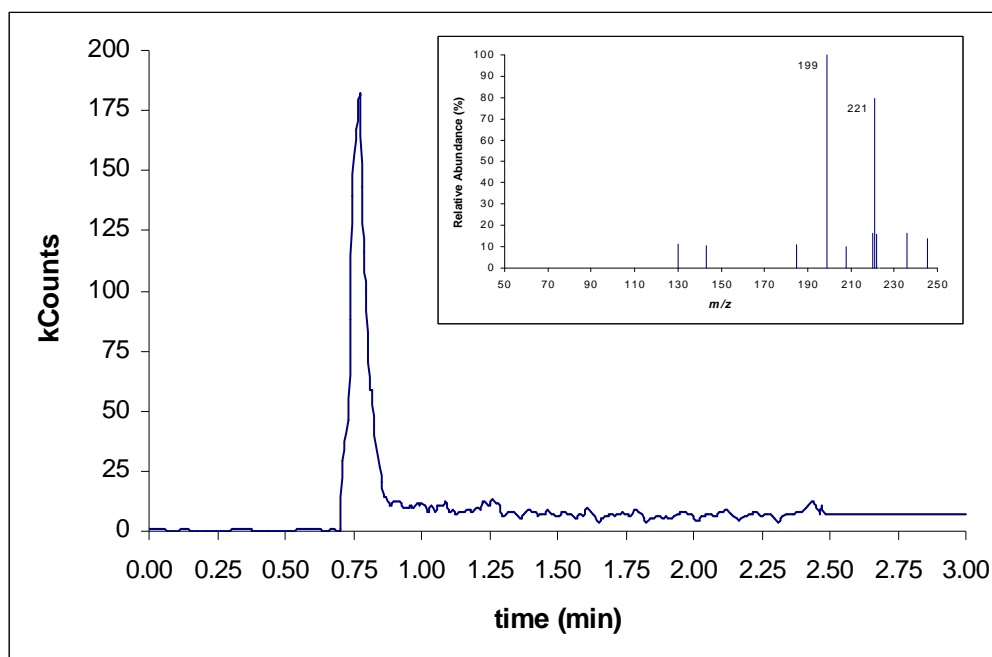


Figura 22-Cromatograma obtido por injeção directa de um padrão de cimoxanil de 5 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS.

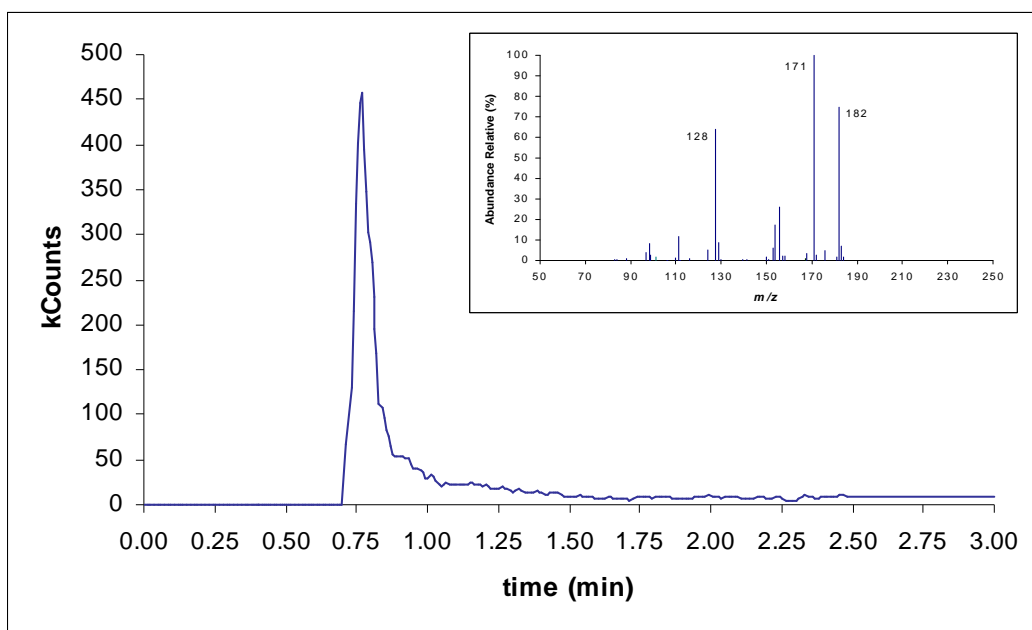


Figura 23-Cromatograma obtido por injeção de um padrão extraído de cimoxanil de 2,5 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS/MS.

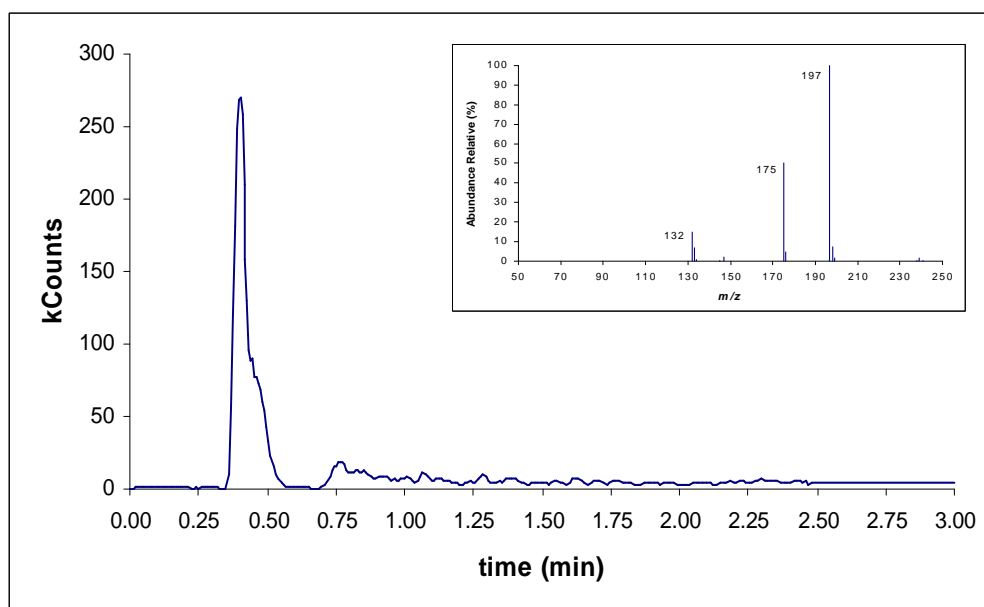


Figura 24-Cromatograma obtido por injeção de um padrão extraído de bentazona de 0,5 ppm e o espectro de massa correspondente, em LC/MS/MS.

5. Conclusões

Implementou-se um método multiresíduo de SPE-HPLC-UV para pesticidas de diferentes grupos (cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão), o qual permite a monitorização de um grande número de amostras de água e foi iniciado um método de confirmação que recorre a LC/MS.

Os limites de detecção obtidos recorrendo à recta de calibração de padrões extraídos, para o método de screening por HPLC-UV, foram de 70 ppb, 39 ppb, 420 ppb e 470 ppb para o cimoxanil, a bentazona, o 2,4-D e o diurão, respectivamente.

Obtiveram-se valores de recuperação média de 90,1%, 52,1%, 88,0%, 91,6% para o cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente.

Recorrendo à metodologia da EuraChem foi possível determinar os coeficientes de incerteza global para cada um dos pesticidas, tendo-se obtido valores de 10,8%, 21,8%, 34,5% e 55,8% para a cimoxanil, bentazona, 2,4-D e diurão, respectivamente.

6. Avaliação do trabalho realizado

6.1. Objectivos realizados

Foi possível determinar um método de extracção em fase sólida para os pesticidas em estudo.

Optimizaram-se as condições necessárias para serem realizadas análises de amostras reais recorrendo a SPE-HPLC-UV, obtendo-se assim um método multiresíduo para monitorizar um grande número de amostras.

Realizou-se a identificação e optimização de padrões de todos os pesticidas em estudo por injeção directa em LC/MS e LC/MS/MS.

Optimizaram-se as condições para identificação e quantificação de bentazona e cimoxanil recorrendo a injeção directa e injeção de padrões de mistura extraídos.

6.2. Outros trabalhos realizados

Durante a realização deste estudo foram também realizados ensaios preliminares de SPME-HPLC-UV para padrões de paraquato utilizando uma fibra de poliacrilato e testando tempos de adsorção e dessorção diferentes, assim como vários valores de temperatura de extracção.

Foi proporcionada a frequência de uma formação interna de LC/MS realizada pelo Dr. João Grave da empresa Emílio e Azevedo de Campos, S.A., na qual foram explicados os procedimentos necessários ao funcionamento deste equipamento.

Por último tivemos oportunidade de apresentar um trabalho num “workshop” de LC/MS, “LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR SCREENING AND TRACE LEVEL QUANTITATION IN ENVIRONMENTAL AND FOOD SAMPLES”, que decorreu a 7 e 8 de Fevereiro em Barcelona e onde foi apresentado um poster sobre o tema desta tese (Ver anexo F).

6.3. Limitações e trabalho futuro

Os ensaios que devem ser realizados para melhorar este método são relativos à etapa de confirmação em LC/MS. De modo a ser possível obter resultados utilizando padrões extraídos para todos os pesticidas em estudo, poderiam ser efectuadas análises, recorrendo a padrões individuais extraídos, uma vez que, nos ensaios de amostras reais, em geral, quando existem pesticidas, são de um só tipo.

Referências

Azevedo, Débora de Almeida; Lacorte, Sílvia; Vinhas, Tereza; Viana, Paula; Barceló, Damià, Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 879, 13-26, 2000.

Beltran, J.; López F.J.; Hernández, F., Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis, *Journal of Chromatography A*, Vol. 885, 389-404, 2000.

Borba da Cunha, A. C.; López de Alda, M. J.; Barceló, D.; Pizzolato, T. M.; Santos, J. H. Z., Multianalyte determination of different classes of pesticides (acid, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.*, Vol. 378, 940-954, 2004.

Catalina, M. Isabel, Dallüge, Jens, Vreuls, René J.J., Brinkman, Udo A. Th., Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid-liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 877, 153-166, 2000.

Council of the European Communities Directive 2000/60/EC, off J Eur. Commun L327:1., 2000.

Directiva Europeia, Directiva do Parlamento Europeu e do Concelho, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, 17 de Julho de 2006 (2006/0129/CE), 2006.

Eurachem/Citac Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Ellison, Rosslein and Williams Editors, 2ª edição, 2000.

Fritz, James S., Analytical solid-phase extraction, 2th edition, John Wiley & Sons, 1999, ISBN: 0-471-24667-0.

Giacomazzi, S.; Cochet, N., Environmental impact of diuron transformation: a review, *Chemosphere*, Vol. 56, 1021-1032, 2004.

Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.; Lara, A; Pitarch, E., Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub-µg/L level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 939, 1-11, 2001.

Hogenboom, A.C.; Speksnijder, P.; Vreeken, R.J.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A.Th., Rapid target analysis of microcontaminants in water by on-line single-short-column liquid

chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 794, 201-210, 1998.

Kampioti, Adamantia A.; Borba da Cunha, Ana C.; López de Alda, Maria; Barceló, Damià, Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at pictogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.*, Vol.382, 1815-1825, 2005.

Kuster, M.; Alda, M.; Barceló D., Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 25, 900-916, 2006.

Kuster, Marina; López de Alda, Maria José; Barata, Carlos; Raldúa, Demetrio; Barceló, Damià, Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, Vol. 75, 390-401, 2008.

Niessen, W.M.A., *Liquid chromatography-mass spectrometry*, 3th edition, Taylor and Francis group, 2006, ISBN-10: 0-8247-4082-3.

Niessen, W.M.A., State-of-art in liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 856, 179-197, 1999.

Pang, Guo-Fang; Cao, Yan-Zhong; Zhang, Jin-Jie; Fan, Chun-Lin; Liu, Yong-Ming; Li, Xue-Min; Jia, Guang-Qun; Li, Zeng-Yin; Shi, Yu-Qiu; Wu, Yan-Ping; Guo, Tong-Tong, Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid Chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1125, 1-30, 2006.

Peña, Fernando; Cárdenas, Soledad; Gallego, Mercedes; Valcárcel, Miguel, Analysis of phenylurea herbicides from plants by GC/MS, *Talanta*, Vol. 56, 727-734, 2002.

Picó, Yolanda; Fernández, Mónica; Ruiz, Maria Jose; Font, Guillermina, Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment, *J.Biochem. Biophys., Methods* 70, 117-131, 2007.

Ratola, Nuno; Martins, Luís; Alves, Arminda, Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with results, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 513, 319-324, 2004.

Rodrigues, Alexandre Mourão; Ferreira, Vera; Cardoso, Vitor Vale; Ferreira, Elisabete; Benoliel, Maria João, Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1150, 267-278, 2007.

Sabik, Hassan; Jeannot, Roger; Rondeau, Bernard, Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters , Journal of Chromatography A, Vol. 885, 217-236, 2000.

Stoob, Krispin; Singer, Heinz P.; Goetz, Christian W.; Ruff, Matthias; Mueller, Stephan R., Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry Quantification of sulphonamide antibiotics, neutral and acid pesticides at low concentrations in surface waters, Journal of Chromatography A, Vol. 1097, 138-147, 2005.

Supelco, Extract Nonvolatile Pesticides from Drinking Water, Using a Graphitized Carbon Adsorbent, 1997.

Taguchi, Vince Y.; Jenkins, Steve W.D.; Crozier, Patrick W.; Wang, David T., Determination of Diaquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography-(Electrospray Ionization) Mass Spectrometry, Journal of American Society for Mass Spectrometry, 1998.

The Pesticide Manual: a world compendium, Vol.1, 11th Edition, CDS Tromlin, British Crop Protection, 1997, ISBN: 1-901396-11-8.

Thorstensen, Christian W.; Lode, Olav; Christiansen, Agnethe L., Development of a solid-phase extraction method for phenoxy acids and bentazone in water and comparison to liquid-liquid extraction method, J. Agric. Food Chem., Vol. 48, 5829-5833, 2000.

Tran, Anh T. K.; Hyne, Ross V.; Doble, Philip, Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC, Chemosphere, Vol. 67, 944-953, 2007.

Vink, M.; Poll, J.M. van der, Gas chromatographic determination of acid herbicides in surface water samples with electron-capture detection and mass spectrometric confirmation, Journal of Chromatography A, Vol. 733, 361-366, 1996.

Wells, Martha J. M.; Yu, Lan; Zhou, Lan, Solid-phase extraction of acid herbicides, Journal of Chromatography A, Vol. 885, 237-250, 2000.

Zanella, Renato; Primel Ednei G.; Gonçalves, Fábio F.; Kurz, Márcia H.S.; Mistura, Clóvia M., Development and validation of high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters, J. Sep. Sci., Vol. 26, 935-938, 2003.

Sites:

[1]- EPA, <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/di-oxyac.html> (18/12/07)

[2]- IPCS (international programme on chemical safety),
<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg048.htm> (05/02/08)

[3]-EXTOXNET, (Extension Toxicology Network, 1997,
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/cymoxanil-ext.html>
(05/02/08)

[4]-Waters Corporation, 2008, <http://www.waters.com/> (10/02/08)

[5]- Varian, 2007,
<http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/chrom/lcms/esi&cid=KHJMLLOMFN>
(10/02/08)

Anexo A. Dados referentes às rectas de calibração por injeção directa de padrões de mistura

Tabela 14-Valores de concentração e áreas obtidas para cada um dos pesticidas por injeção directa de padrões de mistura e que foram usados para a recta de calibração.

Composto							
Cimoxanil		Bentazona		Diurão		2,4-D	
C padrão (ppm)	A	C padrão (ppm)	A	C padrão (ppm)	A	C padrão (ppm)	A
0,25	21067	0,25	19532	0,20	12822	0,20	8429
0,50	43559	0,50	47144	0,40	32272	0,40	19544
0,75	65208	0,75	71545	0,60	65020	0,60	22243
1,00	84242	1,00	92860	0,80	76589	0,80	30942
2,50	218715	2,50	241580	2,00	225707	2,00	94324
5,00	451787	4,00	397339	3,20	376284	3,20	160309
		5,00	497727	4,00	469975	4,00	213418

Tabela 15-Dados de linearidade das rectas de injeção directa para cada um dos pesticidas em estudo, cimoxanil (CIM), bentazona (BEN), 2,4-D e diurão (DIU), em que Sa/a % é o desvio relativo do declive.

Dados de linearidade				
CIM				
	Recta de ajuste: $y = 9,06E+04 \cdot x - 3620,5$	Sa/a	b+Sb	-1811
		1%	b-Sb	-5430
BEN				
	Recta de ajuste: $y = 1,00E+05 \cdot x - 5458,8$	Sa/a	b+Sb	-4012
		1%	b-Sb	-6906
2,4-D				
	Recta de ajuste: $y = 5,36E+04 \cdot x - 7243$	Sa/a	b+Sb	11597
		13%	b-Sb	-26083
DIU				
	Recta de ajuste: $y = 1,21E+05 \cdot x - 13954$	Sa/a	b+Sb	29884
		14%	b-Sb	-57792

Anexo B. Dados referentes às rectas de calibração por injeção de padrões extraídos**Tabela 16-**Valores de concentração e áreas obtidas para cada um dos pesticidas por injeção de padrões de mistura extraídos e que foram usados para a recta de calibração.

Composto							
Cimoxanil		Bentazona		Diurão		2,4-D	
C padrão (ppm)	A	C padrão (ppm)	A	C padrão (ppm)	A	C padrão (ppm)	A
0,10	792090	1,0	1489818	0,2	3176	0,6	903735
0,15	1101709	1,25	3020719	0,3	85672	0,8	2161440
0,20	1725674	2,5	9216743	0,6	43157	1,2	3390528
0,30	2178019			0,8	240552	1,4	3808898
0,40	2745446			1,3	807120	2,5	7449266
0,50	3202357			2,5	2480641	5,0	12883599
						1,00	2549078
						1,30	3744215
						2,50	7119902

Tabela 17-Dados de linearidade das rectas injeção de padrões extraídos para cada um dos pesticidas em estudo, cimoxanil (CIM), bentazona (BEN), 2,4-D e diurão (DIU), em que Sa/a % é desvio relativo do declive.

Dados de linearidade				
CIM				
	Recta de ajuste: $y = 6,00E+06 \cdot x + 187313$	Sa/a	b+Sb	330189
		8%	b-Sb	44437
BEN				
	Recta de ajuste: $y = 5,00E+06 \cdot x - 3,00E+06$	Sa/a	b+Sb	-2353898
		9%	b-Sb	-3646102
2,4-D				
	Recta de ajuste: $y = 3,00E+06 \cdot x + 63638$	Sa/a	b+Sb	530886
		7%	b-Sb	-403610
DIU				
	Recta de ajuste: $y = 1,00E+06 \cdot x - 338201$	Sa/a	b+Sb	-198553
		12%	b-Sb	-477849

Anexo C. Dados referentes aos ensaios de precisão

Tabela 18-Valores de concentração, área dos picos, área média e coeficiente de variação para cada um dos compostos.

Composto	Concentração (ppm)	Área dos picos	Área média	CV%
Cimoxanil	0,4	2102543 2413104 1861650 2207937 2303771 2537338 2513373 2706898	2330827	11,61
Bentazona	1,2	1537256 1717864 1598678 1786762 1493730 1638857 1354369 1377781	1563162	9,80
2,4-D	1,2	2213083 2499049 2893793 3212692 3671529 3932860 3592716 3774895	3223827	19,61
Diurão	1,2	313070 348501 276917 290914 1237100 1328969 1230561 1286622	789082	65,43

Anexo D. Equações usadas para determinar os parâmetros de linearidade

Equação de recta

$$y = mx + b \quad (1)$$

Desvio-padrão dos resíduos da linearidade de y sobre x

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (2)$$

y_i - valores de área para os vários ensaios

\hat{y}_i - valores de área calculados pela recta de calibração

n - número de ensaios realizados

Desvio-padrão associado ao declive

$$S_a = \sqrt{\frac{S_{y/x}^2}{\sum_i (x_i - x_m)^2}} \quad (3)$$

x_i - valores de concentração para cada um dos ensaios

x_m - valor de concentração média

$S_{y/x}$ - desvio padrão dos resíduos de linearidade de y sobre x

Desvio-padrão associado à ordenada na origem

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{y/x}^2 \sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - x_m)^2}} \quad (4)$$

x_i - valores de concentração para cada um dos ensaios

x_m - valor de concentração média

$S_{y/x}$ - desvio padrão dos resíduos de linearidade de y sobre x

n - número de ensaios

Anexo E. Equações usadas na estimativa da incerteza global

Estimativa da incerteza associada à preparação dos padrões

$$u_{pp} = \left[\sum \left(\frac{\Delta m_i}{m_i} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (5)$$

Δm_i - erro associado a cada uma das medições

m_i - valor medido

Incerteza associada às rectas de calibração

$$u_{x0} = \frac{S_{y/x}}{a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - y_m)^2}{a^2 \sum_i (x_i - x_m)^2}} \quad (6)$$

m - número de ensaios efectuados

n - número de repetições

x_m - x médio

y_0 - cada um dos valores de área

y_m - área média

a - declive da recta de calibração

$S_{y/x}$ - desvio padrão dos resíduos de linearidade de y sobre x

Incerteza associada à precisão

$$u_p = \frac{DsP}{med \sqrt{n}} \quad (7)$$

DsP - desvio padrão dos valores obtidos nos ensaios de precisão

med - área média

n - número de ensaios

Incerteza associada à exactidão

$$u_e = \frac{DsP_R}{med\sqrt{n}} \quad (8)$$

DsP_R- desvio padrão relativo aos ensaios de recuperação

med- área média

n- número de ensaios

A incerteza global é a assim calculada recorrendo à equação seguinte:

$$U_{global} = \left(u_{pp}^2 + u_{xo}^2 + u_p^2 + u_e^2 \right)^{0,5} \quad (9)$$

Anexo F. Poster apresentado no workshop de LC/MS



MULTIRESIDUE ANALYSIS OF SELECTED POLAR PESTICIDES IN WATERS BY SOLID PHASE EXTRACTION – LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY

Rita Araújo, Vera Homem, Lúcia Santos and Arminda Alves

LEPAE, Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal; e-mail: aalves@fe.up.pt

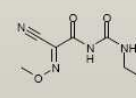
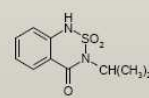
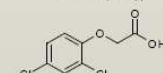
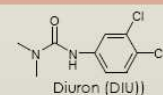
INTRODUCTION

Multiresidue analysis of pesticides in waters is of increasing importance for quality control laboratories, mainly if the targets are the priority compounds included in the Water Framework Directive (2000/60/EC).

Two problems arise in this kind of analysis - the great diversity (in terms of physico-chemical behaviour) of the target compounds and the obligation to observe maximum legal limits if and when they are set. The first problem is usually overcome by the analytical methods used, where high resolution gas or liquid chromatography coupled with mass spectrometry with previous extraction methods can detect a large number of compounds in a single run.

The second problem, besides the need to reach low detection limits, deals with the validation of the analytical methodologies and assessment of the global uncertainty associated with the final results.

In this work, a multiresidue approach to implement, validate and evaluate the global uncertainty (accordingly to Eurachem), was used to analyse four selected pesticides - cymoxanil, bentazone, diuron and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid - in waters.



EXPERIMENTAL



Solid Phase Extraction / Rotary Evaporation

SPE Column: Supelclean™ Env™ - Carb SPE Tubes (3 mL, 250 mg)
Conditioning:
- 6 mL acetone
- 6 mL acidified water (0.2 % HCl)
Sorption:
- 100 mL water sample
Elution:
- 1 mL methanol
- 6 mL acetone
Flow rate: 1 mL/min
Concentration by rotary evaporator to dryness.
Recovery with:
- 1 mL mobile phase for HPLC-UV
- 5 mL acetonitrile for LC-MS

HPLC: Knauer
Column: Nucleosil 100-5 C18 MN
Injection Volume: 100 µL
Flow Rate: 1 mL/min
Mobile Phase:
50:50 Methanol/Water with 0.01% trichloroacetic acid (pH=3)
Detection: UV at 230 nm

LC-MS: Varian 500-MS LC Ion Trap Mass Spectrometer equipped with an ESI source
Column: Polaris C18A 5 µm, 50 x 2 mm ID
Solvent A: Water
Solvent B: Acetonitrile
Flow Rate: 0.2 mL/min
Injection Volume: 10 µL
LC Program:

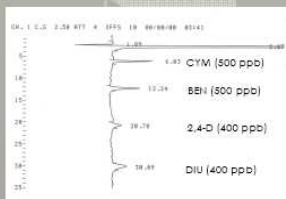
Time (min)	%A	%B
0.00	0	100
1.23	0	100
1.50	40	60
2.25	40	60
2.50	0	100
3.00	0	100



LC-MS/MS AS CONFIRMATION METHOD

	CYM	BEN	2,4-D	DIU
MS Parameters				
Ionization Mode	positive	negative	negative	positive
Nebulizing Gas	25 psi	55 psi	52 psi	30 psi
Drying Gas				
Pressure	10 psi	30 psi	19 psi	25 psi
Temperature	350 °C	330 °C	250 °C	350 °C
Needle	5500 V	4000 V	3500 V	5000 V
Shield	600 V	600 V	600 V	600 V
Capillary	50 V	55 V	30 V	40V
RF loading	63 %	51 %	100 %	72 %
MS/MS Parameters				
Precursor Ion (m/z)	199, 221	239	219	233, 235
Product Ion (m/z)	171, 182, 128	197, 175, 132	161	72, 160
Excitation Amplitude	1.10 V	0.68 V	0.72 V	0.64 V

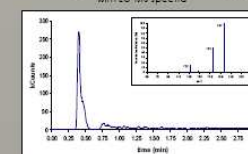
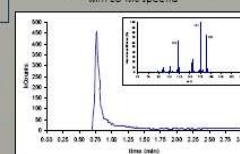
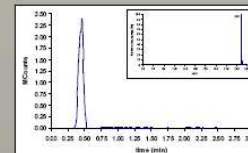
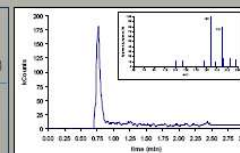
RESULTS



VALIDATION PARAMETERS FOR SPE/HPLC-UV METHOD

	Linearity Range (ppb)	Regression (Corr.) ^a	LOD	%R	CV%	Global uncertainty (%)
CYM	50-500	y=6.0056x+1.8755 (0.979)	10	90.1	10.5	6.9
BEN	500-2500	y=5.0056x-3.0056 (0.989)	323	52.1	9.0	16.6
2,4-D	400-2500	y=3.0056x+6.3564 (0.987)	467	58.0	20.6	36.4
DIU	100-2500	y=1.0056x-3.8855 (0.938)	356	91.6	70.6	57.4

^aCalibration curve with extracted standards; LOD - limit of detection; %R - Recovery percentage and CV% - coefficient of variation from 4 independent extractions

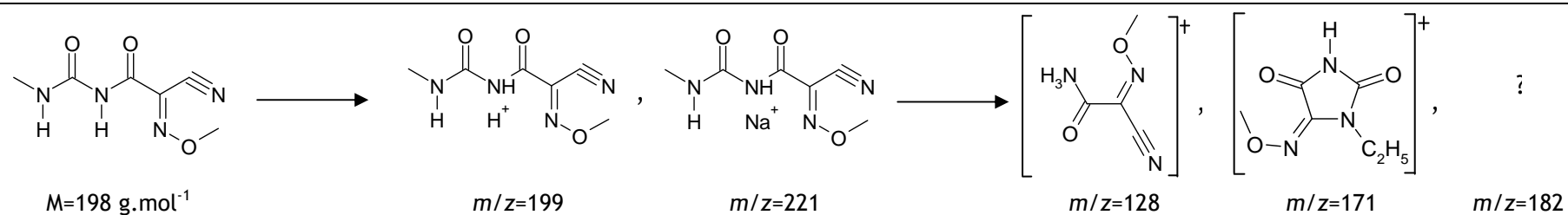
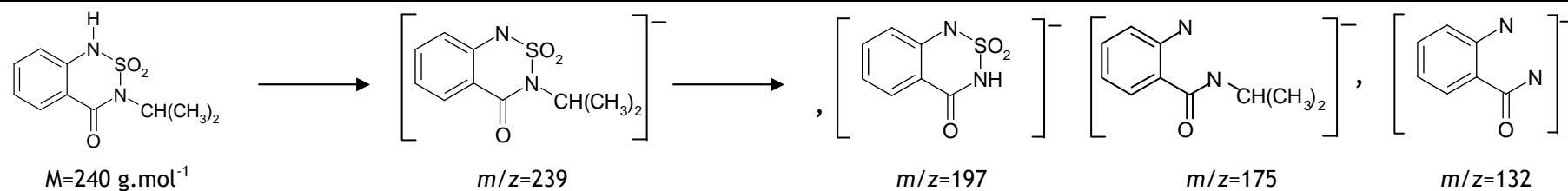


CONCLUSIONS

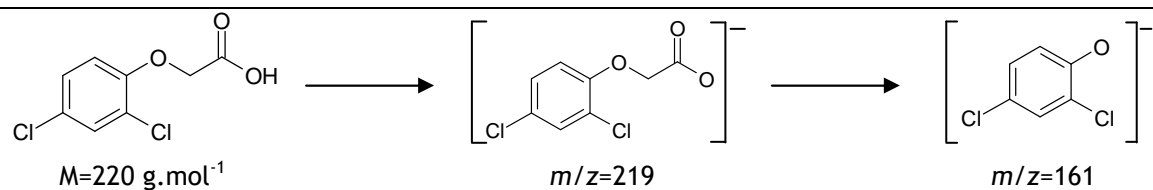
A multiresidue analysis was implemented and validated, which includes a SPE/HPLC-UV method for screening a large number of water samples and a SPE/LC-MS/MS for confirmation purpose.

Limits of detection ranged from 10 ppb (CYM) to 467 ppb (2,4-D). Global uncertainties, accordingly to Eurachem approach were from 6.9% (CYM) to 57.4% (DIU).

Anexo G. Fragmentação de cada um dos pesticidas em estudo

- Cimoxanil**- Bentazona**

- 2,4-D



- Diurão

